

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CO-ENCAPSULAÇÃO DE INDOMETACINA/ ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA E
ALFA-BISABOLOL EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS: EFEITO CITOTÓXICO E
SELETIVO EM CÉLULAS
DE GLIOMA**

Thatiana Ferreira Terroso

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CO-ENCAPSULAÇÃO DE INDOMETACINA/ ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA E
ALFA-BISABOOL EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS: EFEITO CITOTÓXICO E
SELETIVO EM CÉLULAS
DE GLIOMA**

Dissertação apresentada por **Thatiana Ferreira Terroso**
para obtenção de GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana M. O. Battastini

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 09 de dezembro de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Helder Teixeira Ferreira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Maria Martha Campos

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

T328c Terroso, Thatiana Ferreira

Co-encapsulação de indometacina / éster etílico de indometacina e alfa-bisabolol em nanocápsulas poliméricas : efeito citotóxico e seletivo em células de glioma / Thatiana Ferreira Terroso – Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xviii, 118 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmacologia. 2. Indometacina . 3. Glioma . 4. Nanocápsulas poliméricas . I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. II. Battastini, Ana M. O. III. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecárias responsáveis:

Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Cláudia da Silva Gonçalves de Leon – CRB 10/1012

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios 405 da Faculdade de Farmácia, 22 do Departamento de Bioquímica e K204 do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com bolsa de estudos financiada pelo CNPq.

“O que sabemos é uma gota comparada ao oceano do que não sabemos”.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À Profa. Sílvia, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade concedida de trabalhar ao seu lado durante os anos de iniciação científica e mestrado. Pela orientação, paciência e sobretudo pelos ensinamentos compartilhados.

À Profa. Ana Battastini, pela co-orientação que foi fundamental para a realização deste trabalho. Pela valiosa oportunidade de colaboração, por toda confiança concedida.

À Profa. Adriana Pohlmann pela oportunidade de colaboração e pelas contribuições no decorrer deste trabalho.

À querida Andressa Bernardi, pela valiosa colaboração, por nunca ter medido esforços para me ajudar nos experimentos. Pelos ensinamentos e apoio durante todo o tempo de convivência. Por todas as nossas conversas e pela amizade construída.

Ao Rudimar e à Profa. Christianne Salbego, pela oportunidade de colaboração, pela disposição e atenção dadas durante o experimento de cultura organotípica.

À Marli, Camila e Cristina pela grande ajuda na síntese do éster de indometacina.

À todos os colegas antigos e novos do laboratório 405 e do grupo de pesquisa pela amizade, ensinamentos e troca de experiências desde a graduação: Irene Kulkamp, Denise Jornada, Karina Paese, Manuela França, Ana Luiza Maurer da Silva, Scheila Schaffazick, Maiara Pigatto, Letícia Colomé, Letícia Cruz, Franceline Reynaud, Fernanda Bruxel, Renata Raffin, Taís Durli, Renata Contri, Mariana Bianchin, Kelly Bueno da Silva, Fernanda Polleto, Evelise Assumpção, Cássia Detoni, Angelo Zanotto, Eduardo Bender, Gabriela Garrastazu, Luana Fiel, Tatiele Katzer, Karine Coradini, Márcia Fontana, Aline Ourique, Frantiescoli Dimer, Rossana Friedrich, Cristina Venturini, Marli Tebaldi, Camila Franco, Guilherme Soares, Manoel Ortiz, Grégory Svetlichny, Stela Ferrarini, Júlia Santos, Francine Johansson, Bruna Torres, Liberato, Sandra Haas, Rúbia Toigo e Tatiane Daboit.

Ao pessoal do laboratório 22 do Departamento de Bioquímica, em especial ao Fabrício, pela ajuda concedida.

À Faculdade de Farmácia e ao PPGCF, aos professores e funcionários que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À UFRGS pela oportunidade de realizar meus estudos da graduação ao Mestrado.

Ao CNPq, órgão financiador da bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho.

À minhas queridas colegas e amigas Amanda Piccoli Frasson, Amanda Thomas Barden, Andrea Pereira, Karine Ferronato, Maiara Pigatto e Marcella Oliveira, pelos maravilhosos momentos compartilhados durante a graduação e o mestrado.

Aos meus amigos de infância, pelos encontros quase semanais, pelas conversas, pela convivência, carinho, e por ilustrarem perfeitamente a palavra amizade.

Aos meus pais, Mário e Clarinda, pela formação que me propiciaram, pela paciência e carinho. Sobretudo pelo constante incentivo e por terem me apoiado em todas as decisões.

Aos meus irmãos e avó, Thayse, Thales e Nair, pelo carinho, apoio e amizade.

Ao Pedro, pelo amor, companheirismo, incentivo, paciência, ajuda, pelas discussões científicas e por me fazer feliz! À sua família pelo carinho, paciência e acolhida.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abisab – α -bisabolol

Abisab-NC - nanocápsulas contendo α -bisabolol (α -bisabolol *-loaded Nanocapsules*)

Abisab/IndOH-NC - nanocápsulas contendo α -bisabolol e indometacina (α -bisabolol and **indomethacin** *-loaded Nanocapsules*)

Abisab/IndOEt-NC - nanocápsulas contendo α -bisabolol e éster etílico de indometacina (α -bisabolol and **Indomethacin Ethyl Ester** *-loaded Nanocapsules*)

Abisab/IndOH/IndOEt-NC - nanocápsulas contendo α -bisabolol, indometacina e éster etílico de indometacina (α -bisabolol, indomethacin and **Indomethacin Ethyl Ester** *-loaded Nanocapsules*)

AAS - ácido acetilsalicílico (*acetylsalicylic acid*)

AINEs – anti-inflamatórios não-esteróides

AKT/PKB - proteína cinase B (*Protein Kinase B*)

ANOVA- (*one-way analysis of variance*)

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - adenosina trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)

BBB - barreira hemato-encefálica (*Blood-Brain Barrier*)

BHE - Barreira Hemato-Encefálica

CsA- ciclosporina **A**

CDKs - ciclina dependente de cinases (*Cyclin-Dependent Kinase*)

CDK4 - ciclina dependente de cinase 4 (*Cyclin-Dependent Kinase 4*)

CDK6 - ciclina dependente de cinase 6 (*Cyclin-Dependent Kinase 6*)

CNS - sistema nervoso central (*Central Nervous System*)

COX - ciclooxigenase (*Cyclooxygenase*)

COX-1 - ciclooxigenase-1 (*Cyclooxygenase-1*)

COX-2 - ciclooxigenase-2 (*Cyclooxygenase-2*)

COX-3 - ciclooxigenase-3 (*Cyclooxygenase-3*)

DMEM - meio de cultivo celular de Eagles modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DMSO - dimetilsulfóxido (*Dimethylsulphoxide*)

DNA – ácido desoxiribonucleico (*Desoxiribonucleic acid*)

EGFR - receptor de fator de crescimento endothelial (*Endothelial Growth Factor Receptor*)

EPR - efeito de retenção e permeabilidade (*Effect of Permeability Retention*)

ERK - proteína cinase regulada por sinais extracelulares (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*)

FBS - soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

GBM - Glioblastoma

GFAP - proteína glial fibrilar ácida (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)

HBSS - solução salina balanceada de Hank's (*Hank's Balanced Salt Solution*)

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

IL-6 - interleucina-6 (*Interleukin-6*)

IL-10 - interleucina-10 (*Interleukin-10*)

IL-18 - interleucina-18 (*Interleukin-18*)

IL-1 β - interleucina -1 beta (*Interleukin-1beta*)

IndOH - indometacina (*Indomethacin*)

IndOH-NC - nanocápsulas contendo indometacina (*Indomethacin-loaded Nanocapsules*)

IndOEt - éster etílico da indometacina (*Indomethacin Ethyl Ester*)

IndOEt-NC - nanocápsulas contendo éster etílico da indometacina (*Indomethacin Ethyl Ester-loaded Nanocapsules*)

LDL - lipoproteínas de baixa-densidade (*Low Density Lipoprotein*)

LOX-5 - 5-lipoxigenase (*Lypooxygenase-5*)

MAPK - proteína cinase ativada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MDR - multi-resistência a drogas (*Mullti-Drug Resistance*)

MEK - proteína cinase ativada por mitógenos ativadora de ERK (*Mitogen-Activated ERK-activating Kinase*)

MEM - meio essencial mínimo (*Minimum Essential Medium*)

mPTP- inibidor específico da abertura de poro de permeabilidade mitocondrial

MTIC - (metiltriaceno- imidazol-carboxamida).

NSAIDs - anti-inflamatórios não-esteróides (*Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*)

MTT - ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide])

NC - nanocápsulas sem ativos (*drug-unloaded Nanocapsules*)

NTA- (*Nanoparticle Tracking Analysis*)

OGD - privação de oxigênio e glicose (*Oxygen-Glucose Deprivation*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - tampão fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PCL - polímero poli (ε-caprolactona) [*Poly(ε-caprolactone)*]

PCS- espectroscopia de correlação de fótons (*photon correlation spectroscopy*)

PEG – polietilenoglicol

PGE2 - prostaglandina E2

PGP - glicoproteína P (***P-glicoprotein***)

POG - privação de oxigênio e glicose

PI - iodeto de propídeo (***Propidium Iodide***)

PTEN - homólogo fosfatase e tensina deletado do cromossomo 10

(***Phosphatase and tensin homologue deleted from chromossome 10***)

SNC- Sistema Nervoso Central

TEM- (***transmission electron microscopy***)

TGF-β - fator de crescimento tumoral- beta (***Tumoral Growth Factor beta***)

TNF-α - fator de necrose tumoral- alfa (***Tumor Necrosis Factor alpha***)

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial (***Vascular Endothelial Growth Factor***)

RESUMO

Gliomas são os tumores mais frequentes e devastadores que acometem o sistema nervoso central. Uma abordagem moderna para o tratamento destes tumores é a utilização de sistemas de liberação modificada de fármacos, entre os quais, destacam-se as nanocápsulas. No presente estudo, propusemos uma nova estratégia no tratamento de gliomas, uma formulação de nanocápsulas co-encapsulando indometacina, éster etílico de indometacina e α -bisabolol. A primeira parte da investigação focou-se na preparação e caracterização físico-química das formulações. As formulações apresentaram diâmetro médio submicrométrico e baixa polidispersão. A análise de retroespalhamento múltiplo de luz demonstrou estabilidade física da formulação. Os efeitos das formulações de nanocápsulas em linhagens celulares de glioma e sobre tecido neural normal também foram estudados. Para tanto, linhagens celulares de glioma (U138-MG and C6) e culturas organotípicas de hipocampo de rato foram utilizadas. O efeito do tratamento com as nanocápsulas sobre o ciclo celular de células de linhagem de glioma foi também investigado. Os resultados mostraram que as formulações de nanocápsulas mostraram-se mais potentes que as soluções das substâncias livres em diminuir a viabilidade celular em linhagens de glioma nas menores concentrações testadas (25, 50 e 75 μ M), sendo a concentração de 50 μ M das formulações de nanocápsulas capaz de causar um efeito antiproliferativo sem promover necrose nestas células. O aparecimento de um pico em sub-G1 no ciclo celular foi observado, sugerindo a indução da morte celular por apoptose realizada pelas substâncias nanoencapsuladas. O efeito citotóxico induzido pelas nanocápsulas sobre células de glioma não foi observado nas culturas organotípicas de hipocampo de rato, mesmo em concentrações elevadas (250 μ M) o que demonstra citotoxicidade seletiva das formulações sobre células tumorais. Estudos adicionais utilizando modelo *in vivo* de glioma podem ser úteis para confirmar a seletividade das formulações.

Palavras-chave: Nanocápsulas poliméricas, células de glioma, cultura organotípica de hipocampo, morte celular, α -bisabolol, indometacina, éster etílico de indometacina.

ABSTRACT

Selective cytotoxic effect upon glioma cells induced by nanocapsules simultaneously containing α -bisabolol, indomethacin and its ethyl ester.

Gliomas are the commonest and devastating tumors of the central nervous system. A modern approach for the treatment of these tumors is the use of modified-release drug systems, which have nanocapsules as a highlight. In the present work, we propose as a novel strategy intended to treat gliomas, a multidrug-loaded nanocapsule formulation co-encapsulating indomethacin, indomethacin ethyl ester and α -bisabolol. So, in a first step of investigation we focused on the preparation and physico-chemical characterization of formulations. The formulations presented submicrometric average diameter and low polydispersity index. The analysis of multiple light backscattering demonstrated that the suspension was physically stable. The aim of this study was also to evaluate the effects of nanocapsule formulations upon glioma cell lines. In addition, the effect of these formulations on normal neural tissue was also evaluated. In order to investigate this, glioma cell lines (U138-MG and C6) and rat hippocampal organotypic cultures were used. The effect of treatment with nanocapsules upon the cell cycle was also investigated. The main finding of the present study is that nanocapsule formulations presents more potent than a correspondent solution in decrease the viability of glioma cell lines in the lower tested concentrations (25, 50 and 75 μ M). The concentration of 50 μ M of nanocapsule formulations was able to cause an antiproliferative effect without promoting necrosis in glioma cells. We observed the appearance of a sub-G1 peak for cells treated with nanocapsule formulations, suggesting the apoptotic nature of the death of glioma cells triggered by nanocapsule formulations. Another important finding was that the cytotoxic effect induced by nanocapsule formulations in glioma cells was not observed in the organotypic cultures even in high concentrations (250 μ M), indicating selective cytotoxicity of those formulations for tumoral cells. Further investigations using in vivo glioma model should be helpful to confirm the distinct effects of these nanocapsule formulations in normal versus tumoral cells.

Keywords: Polymeric nanocapsule, Glioma cell; Hippocampal organotypic culture; Cell death; α -bisabolol, Indomethacin; Indomethacin ethyl ester.

SUMÁRIO

PARTE I

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	05
REVISÃO DA LITERATURA	07
1. Gliomas.....	07
1.1. Aspectos gerais	07
1.2. Glioblastoma	08
1.2.1 Prognóstico e Terapêutica	10
1.3. Proliferação Celular	13
2. Inflamação.....	18
3. Anti-inflamatórios não-esteróides	19
3.1. Indometacina	21
4. Alfa-bisabolol.....	25
5. Nanopartículas	27
5.1. Nanobiotecnologia.....	27
5.2. Sistemas carreadores de fármacos	28
5.2.1. Nanopartículas poliméricas.....	29
5.3. Vetorização de fármacos antitumorais.....	31
5.4. Vetorização de fármacos ao Sistema Nervoso Central.....	33

PARTE II

Co-encapsulation of indomethacin/ ethyl ester of indomethacin and α -bisabolol in polymeric nanocapsules: selective and cytotoxic effect in glioma cells.....	36
--	----

PARTE III

DISCUSSÃO	77
CONCLUSÕES	83
PERSPECTIVAS.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXO	1

PARTE I

INTRODUÇÃO

Os tumores primários do sistema nervoso central (SNC) estão entre as mais prevalentes neoplasias sólidas, representando uma das mais importantes causas de mortalidade por câncer antes dos 15 anos de idade (Baylei et al., 1995). Dentre os vários tipos de tumores do SNC, os mais frequentes são os gliomas (Kleihues & Cavenee, 2000). Apesar do tratamento, gliomas malignos apresentam recorrência precoce, o que conduz a uma sobrevida média inferior a 12 meses (Holland, 2001).

A cirurgia representa o tratamento de primeira escolha para os pacientes com gliomas, entretanto a ressecção completa do tumor é limitada pela alta invasividade das células tumorais nos tecidos normais circundantes, o que leva a uma elevada taxa de recorrência (Behin et al., 2003). Portanto, a maioria dos pacientes é tratada com radioterapia e/ou quimioterapia pós-operatória (Mazeron & Kantor, 1998). Entretanto, estes agentes demonstram eficácia limitada, principalmente pela ausência de especificidade terapêutica dos fármacos citotóxicos contra tais neoplasias, além da quimiorresistência intrínseca destes tumores e da baixa tolerância do tecido normal aos efeitos tóxicos decorrentes à terapia (Mousseau et al, 1993). Além disso, a presença da barreira hematoencefálica limita a penetração de fármacos antineoplásicos em tumores cerebrais (Gelperina et al., 2002). Uma abordagem alternativa para o tratamento de gliomas é o emprego de sistemas de liberação modificada de fármacos, capazes de aumentar ou até mesmo vetorizar a liberação dos agentes antitumorais ao tecido cerebral (Gelperina et al. 2002).

Os anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) são fármacos com propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias (Rang et al, 2001). A ação anti-inflamatória dos AINEs decorre da inibição da síntese de prostaglandinas (PGs), através da inibição da ciclooxigenase (COX). O papel da COX nas neoplasias foi sugerido após a demonstração de que alguns

processos neoplásicos possuem altos níveis de metabólitos do ácido araquidônico, como a prostaglandina E2 (PGE2). 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), sendo que a superexpressão dessa enzima está associada com gliomas clinicamente mais agressivos e de pior prognóstico para o paciente (Shono et al., 2001). Numerosos estudos com linhagens de células malignas, estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado o potencial dos AINEs como agentes farmacológicos de papel benéfico no tratamento e prevenção de vários tipos de câncer (Toomey et al., 2009; Harris, 2009; Hyde & Missailidis, 2009).

O α -bisabolol é um pequeno álcool sesquiterpeno oleoso com massa molecular de 222,37 Da isolado do óleo essencial de uma variedade de plantas, arbustos e árvores. Por exemplo, o óleo essencial de *Matricaria chamomilla* contém até 50% de α -bisabolol e esta é a molécula considerada o principal componente que contribui para o ligeiro efeito anti-inflamatório da camomila (Jakovlev et al., 1969, 1979). Estudos revelaram que o α -bisabolol tem um potente efeito citotóxico tempo- e dose-dependente sobre linhagens celulares de gliomas de ratos e humanos altamente malignos, induzindo rapidamente a apoptose através da via mitocondrial, sem demonstrar efeitos tóxicos nas células normais (Cavalieri et al., 2004).

Na atualidade, as mais promissoras aplicações da nanotecnologia incluem o uso dos nanocarreadores para a veiculação de fármacos empregados no tratamento de diferentes tipos de câncer. Nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o fármaco pode ser confinado em uma cavidade aquosa ou oleosa rodeada por uma única parede polimérica (Jäger et al., 2007), podendo ser consideradas como um sistema "reservatório" (Brigger et al., 2002). Foi relatado que nanopartículas podem ser utilizadas como potenciais transportadoras de fármacos através da barreira hematoencefálica (Lockman et al., 2003; Kozíara et al., 2003). Também foi descrito que os conjugados polímero-fármaco anticâncer acumulam-se mais no tecido tumoral do que nos tecidos normais em comparação com fármacos de baixo peso molecular devido ao aumento da permeabilidade e efeito de retenção (Kim e

Lee, 2001). Adicionalmente, trabalhos demonstraram que a conjugação de polímero-fármaco antitumoral poderia prolongar a atividade farmacológica pela liberação do fármaco em uma taxa controlada (Alonso, 1996; Seijo et al., 1990; Vinogradov et al., 2002).

A abordagem do tratamento de células de glioma por carreadores lipossomais a fim de obter uma maior eficiência ou reduzidos efeitos colaterais tem sido relatada (Hu et al., 1995; Koukourakis et al., 2000). Além disso, as nanopartículas de polímeros biodegradáveis revestidas com polissorbato 80 (Tween 80 ®) foram propostas na literatura para a liberação cerebral de algumas substâncias (McCarthy et al., 2005; Zhang e Feng, 2006; Brioschi et al., 2007).

Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou, com sucesso, uma nova abordagem para o tratamento de gliomas baseada na administração da indometacina, um fármaco AINE, nanoencapsulada. Os resultados evidenciaram que nanocápsulas de indometacina podem ser consideradas promissoras para o tratamento de gliomas, sendo mais efetivas que o fármaco em solução, sem apresentarem os efeitos colaterais da quimioterapia (Bernardi *et al.*, 2008).

No campo da nanotecnologia, uma abordagem moderna é a possibilidade da co-encapsulação de fármacos em nanocápsulas poliméricas. Entretanto, para viabilizar esta possibilidade é necessário considerar os materiais essenciais para a formulação da nanocápsulas, um polímero biodegradável, um óleo para a constituição do núcleo das vesículas, o fármaco e os tensoativos estabilizantes da suspensão. Considerando que o α -bisabolol é um óleo, no presente trabalho ele é proposto, simultaneamente, como substância a ser encapsulada e como componente do núcleo oleoso das nanocápsulas, além de auxiliar na solubilização da indometacina.

Desta forma, sendo os gliomas tumores bastante severos e não existindo alternativas terapêuticas eficientes e não-tóxicas para o seu tratamento, justificam-se as pesquisas nesta área.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Verificar a existência de ação citotóxica seletiva de nanocápsulas contendo indometacina/éster etílico de indometacina e α -bisabolol em células de glioma.

Objetivos específicos:

- Preparar nanocápsulas contendo α -bisabolol, indometacina e éster etílico de indometacina pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado.
- Caracterizar as formulações determinando o diâmetro de partícula, polidispersão, potencial zeta, pH, análise morfológica, estabilidade física e os teores de α -bisabolol, indometacina e éster de indometacina.
- Verificar a ação citotóxica das nanocápsulas contendo os ativos em linhagens de glioblastoma humano U138-MG e C6 de rato.
- Verificar a ação das formulações de nanocápsulas sobre o ciclo celular de células da linhagem celular C6.
- Avaliar o possível efeito citotóxico das formulações de nanocápsulas em tecido neural não-tumoral.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Gliomas

1.1 Aspectos Gerais

As neoplasias do sistema nervoso central (SNC) dividem-se em tumores primários, originários do parênquima, meninges e nervos cranianos, e secundários, originários de tumores que envolvem o cérebro como sítio metastático.

Os gliomas contabilizam mais de 80% dos tumores malignos primários do SNC (Schwartzbaum et al., 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), nos Estados Unidos são estimados 18.500 novos casos de tumores cerebrais primários por ano (Sathornsumetee et al., 2007), com aproximadamente 13.000 mortes. Sua incidência mostra um aumento de 0,9% ao ano, provavelmente devido à crescente melhoria da qualidade do diagnóstico por imagem. Embora os tumores cerebrais representem apenas 2% de todas as neoplasias, eles constituem uma fatia desproporcional da morbidade e mortalidade por câncer (Ries et al., 2004). Dentre os fatores de risco relacionados a estes tumores estão a exposição à radiação ionizante, mutações gênicas e histórico familiar (Schwartzbaum et al., 2006).

Os gliomas representam um dos maiores desafios na oncologia moderna. Embora novos paradigmas terapêuticos tenham determinado impacto significativo no prognóstico de diversas malignidades, a sobrevida entre os pacientes acometidos por glioma não se alterou nas últimas décadas (Rich & Bigner, 2004). Este fato, em parte, deve-se a uma de suas características cardinais, a alta propensão para infiltrar-se através do cérebro, determinando a impossibilidade de cura cirúrgica mesmo quando a localização do tumor permite ampla margem de ressecção (Rao et al., 2001; Maher et al., 2001). Além disso, devido ao seu elevado grau de proliferação, há comprometimento do tecido adjacente ao tumor, desencadeando sintomas como cefaléia, alterações comportamentais e cognitivas, edema de papilas, disfasia e hemiparesia progressiva (Girolami, 2000).

Gliomas têm sido definidos patologicamente como tumores que apresentam evidência histológica, imunohistoquímica e estrutural de diferenciação glial (Maher et al., 2001), desta forma incluindo tumores derivados de astrócitos (astrocitomas), oligodendrócitos (oligodendrogliomas), células ependimais (ependimomas) e mistura de células gliais (oligoastrocitomas). Os astrocitomas são classificados pela OMS em astrocitomas, astrocitomas anaplásticos e glioblastomas.

Tradicionalmente é assumida como mecanismo da gliomagenese a transformação neoplásica de células gliais diferenciadas; entretanto, recentemente foi demonstrado que células-tronco podem estar envolvidas neste processo (Kondo et al., 2006). As células-tronco neurais são reguladas por vias de sinalização celular que também estão ativas em tumores cerebrais, conseqüentemente, elas são capazes de exibir características semelhantes aos gliomas, incluindo alta capacidade proliferativa, elevada motilidade, associação com vasos sanguíneos, desenvolvimento de fenótipos antigênicos imaturos como a expressão de nestina e do marcador de células-tronco neurais CD133, além da ativação de vias sinalizadoras de crescimento e proliferação celular (Sanai et al., 2005). Dessa forma, os gliomas são constituídos por populações heterogêneas contendo uma maior população de células diferenciadas e uma minoria de células tumorigênicas indiferenciadas multipotentes. Embora ambas contenham mutações oncogênicas que poderão resultar na tumorigênese, somente as células-tronco neurais têm capacidade de se autorenovar gerando assim a propagação tumoral (Fomchenko & Holland, 2006; Zheng et al., 2007).

1.2 Glioblastoma

O sistema de classificação da OMS classifica os gliomas em quatro graus de malignidade (I a IV), baseados em suas características histopatológicas (Kleihues et al., 1993; Chintala et al., 1999). O glioblastoma (GBM) corresponde à maioria dos tumores primários em adultos (Nagarajan & Costello, 2009), sendo o mais agressivo e letal subtipo de gliomas malignos, caracterizando-se pela ampla infiltração de células pobremente diferenciadas, apresentando grau IV de malignidade (Laws & Shaffrey et al., 1999, Bachoo et

al., 2002). Pode-se graduar a malignidade dos gliomas em quatro estágios como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos tumores astrocíticos de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde para tumores do SNC.

Tipo de tumor	Grau segundo OMS
Astrocitoma difuso	II
Astrocitoma fibrilar	II
Astrocitoma protoplásmico	II
Astrocitoma gemistocítico	II
Astrocitoma anaplásico	III
Glioblastoma	IV
Glioblastoma de células gigantes	IV
Gliosarcoma	IV
Astrocitoma pilocítico	I
Xantoastrocitoma pleomórfico	II
Xantoastrocitoma pleomórfico com características anaplásicas	Não determinado

Adaptado de Behin et al., 2003.

GBMs dividem-se em dois subtipos, primários e secundários. A grande maioria dos glioblastomas (mais de 90%) constitui os GBMs primários que, tipicamente surgem em pacientes idosos, como um tumor agressivo e altamente invasivo, usualmente sem qualquer evidência clínica prévia da doença, desenvolvendo-se rapidamente (Ohgaki & Kleihues, 2009). Pacientes com GBMs primários apresentam uma curta história clínica (evolução inferior a três meses) e grandes tumores ao diagnóstico, com necrose central, reforço anelar de contraste e edema perifocal na ressonância magnética nuclear (Ohgaki, 2005). Por sua vez, os GBMs secundários desenvolvem-se lentamente por progressão de astrocitomas de baixo grau, sendo observados em pacientes mais jovens. Uma vez estabelecidos, glioblastomas primários e secundários são indistinguíveis clinicamente (Maher et al., 2001; Ohgaki & Kleihues, 2007).

Os GBMs são formados por uma massa intraparenquimal heterogênea apresentando áreas de necrose e hemorragia (Holland et al., 2001).

Microscopicamente a massa tumoral consiste em diferentes tipos celulares: células próprias do glioma, células endoteliais hiperproliferativas, macrófagos e células normais de áreas do cérebro que estão sendo invadidas pelo glioma. Dentre as características histológicas mais comuns, incluem-se regiões de necrose, células dispostas em pseudopaliçada, vasos sanguíneos hipertrofiados no interior e em áreas adjacentes ao tumor, proliferação microvascular, pleomorfismo celular e nuclear, além da intensa capacidade proliferativa (Holland et al., 2001; Dai & Holland et al., 2001).

Devido ao seu rápido crescimento, estas neoplasias provocam extensas áreas de destruição do tecido nervoso, ocasionando edema e necrose (Laws et al., 1999). Um dos mecanismos de morte celular peritumoral ocorre através da liberação de glutamato em concentrações neurotóxicas pelas células malignas. (Takano et al., 2001). Este fenômeno pode explicar parte das convulsões apresentadas pelos pacientes com este tipo de tumor (Ye & Sontheimer, 1999). Além disso, dados do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado o envolvimento do ATP e de seus produtos de degradação no meio extracelular no crescimento dos GBMs (Morrone et al., 2006; Braganhol et al., 2007., Bernardi et al., 2007.; Braganhol et al., 2009).

1.2.1. Prognóstico e Terapêutica

Os pacientes acometidos por glioblastomas apresentam um péssimo prognóstico, uma vez que, apesar de existirem intensos esforços buscando desenvolver novas terapias, agentes efetivos ainda não estão disponíveis (Konopka & Bonni, 2003). Embora o limitado tempo de sobrevida da maioria dos pacientes dificulte a identificação de fatores prognósticos, pesquisadores determinaram alguns dos fatores associados ao tempo e probabilidade de sobrevida, são eles: idade, pontuação no *Karnofsky status*, extensão da ressecção, capacidade de completa ressecção, grau de necrose, evolução de ressonância magnética nuclear pré-operatória, volume de tumor residual, abordagem terapêutica, diâmetro tumoral pré e pós-operatório, localização não-central do tumor, piora clínica, condição do paciente antes da radioterapia e níveis pré-cirúrgicos de albumina sérica (Fisher et al., 2007). Dentre estes, os principais determinantes do tempo médio de sobrevida são a idade do paciente

no momento do diagnóstico e o grau histológico do tumor (Schwartzbaum et al., 2006). Em geral, a probabilidade de sobrevida é menor para aqueles pacientes em idade mais avançada. A Figura 1 apresenta as percentagens relativas de sobrevida dos pacientes em função do grau histológico da neoplasia cerebral. Apesar dos grandes avanços em neuroradiologia, neurocirurgia, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida média dos pacientes com GBM pouco se alterou nos últimos 30 anos, variando entre 9 a 12 meses, a maioria dos pacientes morre no período de 2 anos e 3,3% sobrevive 5 anos (Bondy et al., 2008).

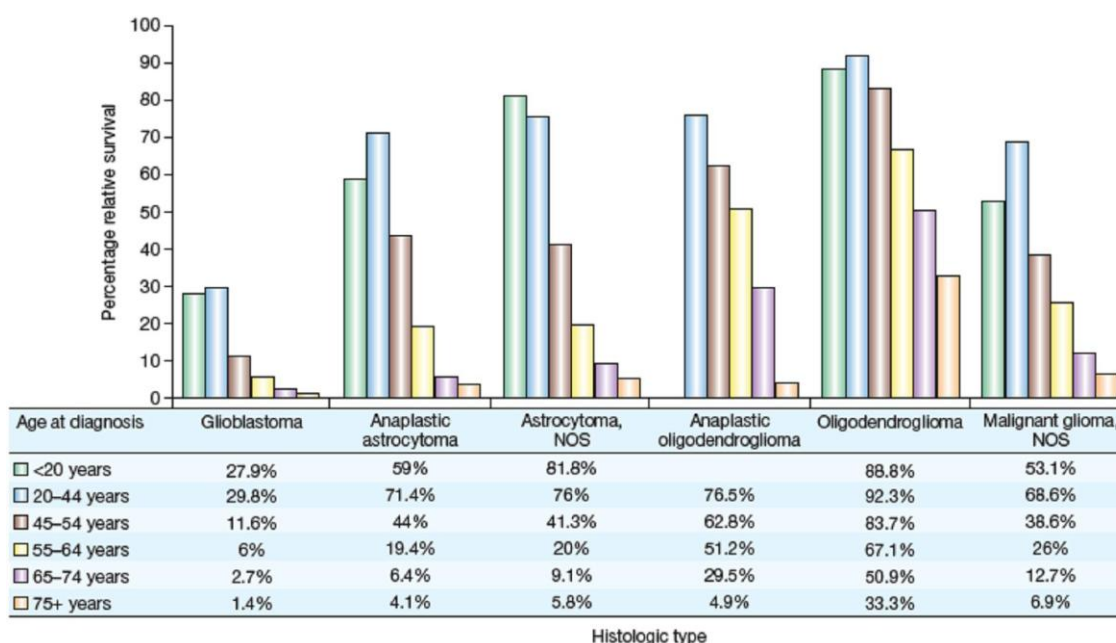


Figura 1. Determinação da sobrevida de pacientes com gliomas em função da idade ao diagnóstico e o grau histológico. Schwartzbaum et al., 2006.

A cirurgia, atualmente, representa a única abordagem com potencial curativo para a maior parte das malignidades sólidas; entretanto, os glioblastomas, na prática, são incuráveis. O tratamento objetiva a melhora dos déficits neurológicos (inclusive função cognitiva) e o aumento da sobrevida, mantendo a melhor qualidade de vida possível. A ressecção completa do tumor é limitada pela alta invasividade microscópica das células tumorais no tecido saudável adjacente (Behin et al., 2003), sendo a recorrência do tumor a regra, uma vez que mesmo após uma remoção cirúrgica com margens livres, permanece no tecido normal uma população de células tumorais (Rooprai et

al., 1999). Desta forma, a maioria dos pacientes recebe tratamento adjuvante, radioterapia e/ou quimioterapia pós-operatória (Mazeron & Kantor, 1998). Ambas as abordagens têm eficácia limitada devido à ausência de especificidade terapêutica dos fármacos citotóxicos atuais contra esta neoplasia, a quimiorresistência intrínseca destes tumores e a baixa tolerância do tecido normal aos efeitos tóxicos da terapia. Além disso, a BHE é limitante à entrada dos quimioterápicos no SNC, de modo que apenas fármacos de caráter altamente lipofílico, como temozolomida e nitrosuréias, podem ser utilizados (Mousseau et al, 1993). O tratamento radioterápico é aplicado através de uma carga de cerca de 60 Gy, focada no tumor e em uma margem de cerca de 2 cm, de maneira a incluir potenciais células malignas no tecido aparentemente normal e minimizar o dano ao cérebro. Este tratamento melhora o controle local da doença e a sobrevida (Andersen, 1978). No tratamento quimioterápico, a temozolomida é atualmente o fármaco de escolha para pacientes com GBM, embora apresente algumas limitações como mielosupressão, leucopenia e trombocitopenia (Friedman et al., 2000; Villano et al., 2009). A temozolomida é um antineoplásico da classe dos agentes alquilantes que na circulação sistêmica, em pH fisiológico, forma o composto ativo MTIC (metiltriaceno- imidazol-carboxamida). O principal objetivo do tratamento com temozolomida é o aumento da sobrevida dos pacientes (Yun et al., 2000; Bondy et al., 2008). A combinação de temozolomida e radioterapia pós-operatórios apresentou aumento da sobrevida estatisticamente significativo (27 versus 11% e 10 versus 2% na sobrevida em 1 e 5 anos respectivamente, risco relativo para morte 0,63, IC 95% 0,53-0,75), sendo o desfecho particularmente bom para os pacientes com menos de 50 anos: sobrevida de 17% em 5 anos (Stupp et al., 2009).

O arsenal terapêutico disponível atualmente para o tratamento dos glioblastomas é incapaz de alterar substancialmente o prognóstico destes pacientes, justificando esforços no intuito de desenvolver e aprimorar abordagens inovadoras.

1.2.2. Proliferação celular

A biologia dos gliomas malignos se associa ao balanço da expressão de proteínas que controlam de maneira positiva ou negativa o ciclo celular, a proliferação, a motilidade, a neovascularização e o reconhecimento do sistema imune. Esses fenômenos são resultado da mudança no nível de expressão de um gene normal ou envolvem a perda de expressão. Dentre os tumores, os glioblastomas apresentam um grande número de anormalidades genéticas. A tumorigênese envolve, em essência, o descontrole das funções de protooncogenes, genes supressores tumorais e genes reparadores de DNA. Tais genes codificam proteínas reguladoras de complexas rotas de transdução de sinais para funções celulares essenciais, tais como: proliferação, diferenciação, apoptose, adesão, migração e angiogênese (Weinberg, 1995; Collins et al., 2002). Dessa forma, a maioria das alterações genéticas identificadas nos GBMs resulta em ativação anormal de vias de sinalização a partir de receptores tirosina-cinase e/ou a partir de perda do controle do ciclo celular (Ohgaki & Kleihues, 2009). A ausência da proteína p53 é um achado bastante comum, resultando em uma rota não funcional para esta proteína. Existe também um mecanismo inoperativo de controle da entrada celular na fase S do ciclo celular. O gene supressor de tumor p53, o qual atua nos checkpoints G1 e G2 promovendo retardo no ciclo celular em resposta ao estresse genotóxico, encontra-se mutado em cerca de 60% dos gliomas de todos os graus. A inativação desse gene promove divisão celular anormal e parece facilitar a transformação anaplásica através da instabilidade genômica, a qual não apenas cria condições para futuras mutações oncogênicas, mas também pode induzir resistência aos fármacos citotóxicos e radiação ionizante (Behin et al., 2003). De fato, a perda do p53 funcional, assim como a superexpressão do gene antiapoptótico bcl-2, tem sido associada à resistência a tais tratamentos nos glioblastomas (Newcomb et al., 1997; Watanabe et al., 1997). Dentre o grupo de alterações resultantes na interrupção das vias de parada do ciclo celular, destacam-se também a deleção de INK4-ARF que codifica proteínas p16INK4A e p14ARF (Nakamura et al., 2001) e a amplificação de CDK4, CDK6 e ciclina D1 (Giani & Finocchiaro, 1994; Sherr et al., 1999). A Figura 2 mostra uma representação do ciclo celular.

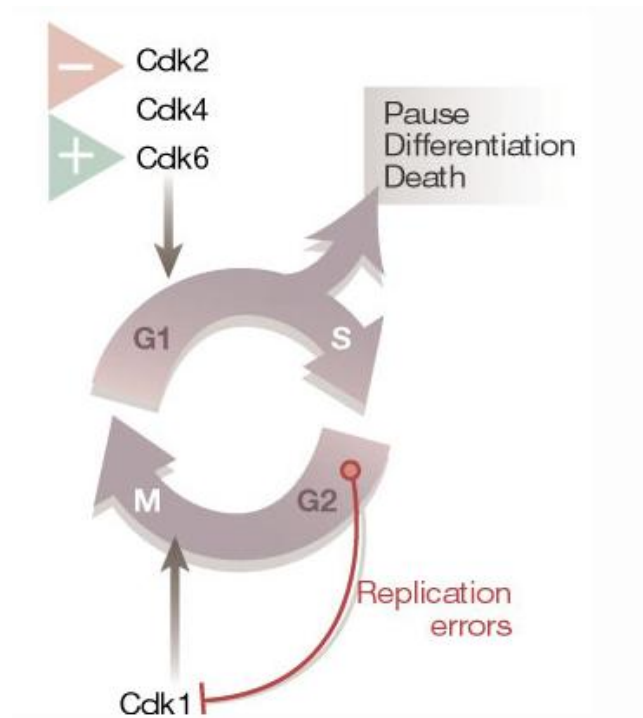


Figura 2. Representação esquemática do ciclo celular. O ciclo celular é continuamente regulado por ciclinas e suas cinases associadas (CDKs). As ciclinas são as subunidades reguladoras e as CDKs as unidades catalíticas. Esses complexos encontram-se ativados quando as CDKs estão fosforiladas. Cada ciclina tende a atuar em etapas diferentes do ciclo celular, fazendo com que as transições entre as diversas etapas do ciclo sejam bem delineadas. Massagué, 2004.

O checkpoint G1 representa um ponto de controle estratégico do ciclo celular, onde a integridade do DNA é verificada. Quando o DNA encontra-se danificado, há um aumento transitório dos níveis da proteína p53, o que induz parada em G1 e bloqueio da DNA polimerase via inibidor de cdk (cyclin-dependent kinase) – p21, impedindo a fosforilação da pRB, necessária para a entrada da célula na fase de síntese (S). Ao término do processo de reparação de DNA, o avanço para a fase S é promovido quando a proteína mdm-2 (murine double minute) se associa a p53, revertendo o bloqueio do ciclo (Rubin & Faber, 1999). Em resposta ao dano do DNA, pode haver regulação do ciclo celular e mecanismos de reparo. O tipo e dose do estresse, dentro do contexto

da célula, parecem ditar a resposta celular, que é convertida em complexas vias mediando o controle do ciclo celular e/ou morte celular. A apoptose parece ser induzida quando o dano excede a capacidade dos mecanismos de reparo (Herr & Debatin, 2001).

Pode-se afirmar que, além da heterogeneidade patológica, os GBMs apresentam uma heterogeneidade molecular. O processo de transformação de uma célula normal em uma célula tumoral é extenso e pode prosseguir por vários caminhos. O sinal para que a célula normal prolifere comumente se inicia na superfície celular, onde os fatores de crescimento liberados pela matriz extracelular e pelo próprio tumor interagem com os receptores específicos na membrana, desencadando diversos mecanismos de sinalização intracelular que afetam a expressão gênica para promover a divisão celular. Podem existir alterações e mutações em cada uma destas vias que em conjunto ou de forma independente podem dar lugar a perda de regulação do ciclo celular, a angiogênese e a proliferação (Demuth et al., 2004). Acredita-se que somente alguns dos processos moleculares são compartilhados por um determinado tipo de neoplasia, de modo que cada tumor possui uma característica genética e epigenética única. Os GBMs desenvolveram a capacidade de expressar seus próprios fatores de crescimento junto aos seus respectivos receptores, resultando na possibilidade de estimulação autócrina (Feldkamp et al., 1997; Tang et al., 1997). Nesse contexto, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é considerado o mais proeminente fator de crescimento angiogênico, sendo superexpresso em 40-60 % de todos os GBMs diagnosticados (Wong et al., 2009). Além disso, os receptores para VEGF são altamente expressos em células endoteliais vasculares e predominantemente em vasos nas proximidades do tumor (Libermann et al., 1984; Ekstrand et al., 1991) de modo que as células tumorais podem migrar e alcançar a circulação através desses novos vasos permeáveis. Apesar da intensa neovascularização capilar, a circulação sanguínea muito frequentemente não é suficiente para áreas tumorais com grande proliferação celular, sendo esse um fator limitante para o crescimento tumoral o que leva ao desenvolvimento de uma área de necrose intratumoral (Schaper & Buschmann, 1999). Como consequência dessa superexpressão de receptores e ligantes, há

um aumento na sinalização, que leva à ativação descontrolada de várias vias de proliferação celular, como por exemplo, a via das MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Ras→ Raf→ MEK→ ERK) e a via da PI3K/AKT, dentre outras. A Figura 3 apresenta, de forma esquemática, os diferentes mecanismos e alterações moleculares que implicam na gênese de glioblastomas.

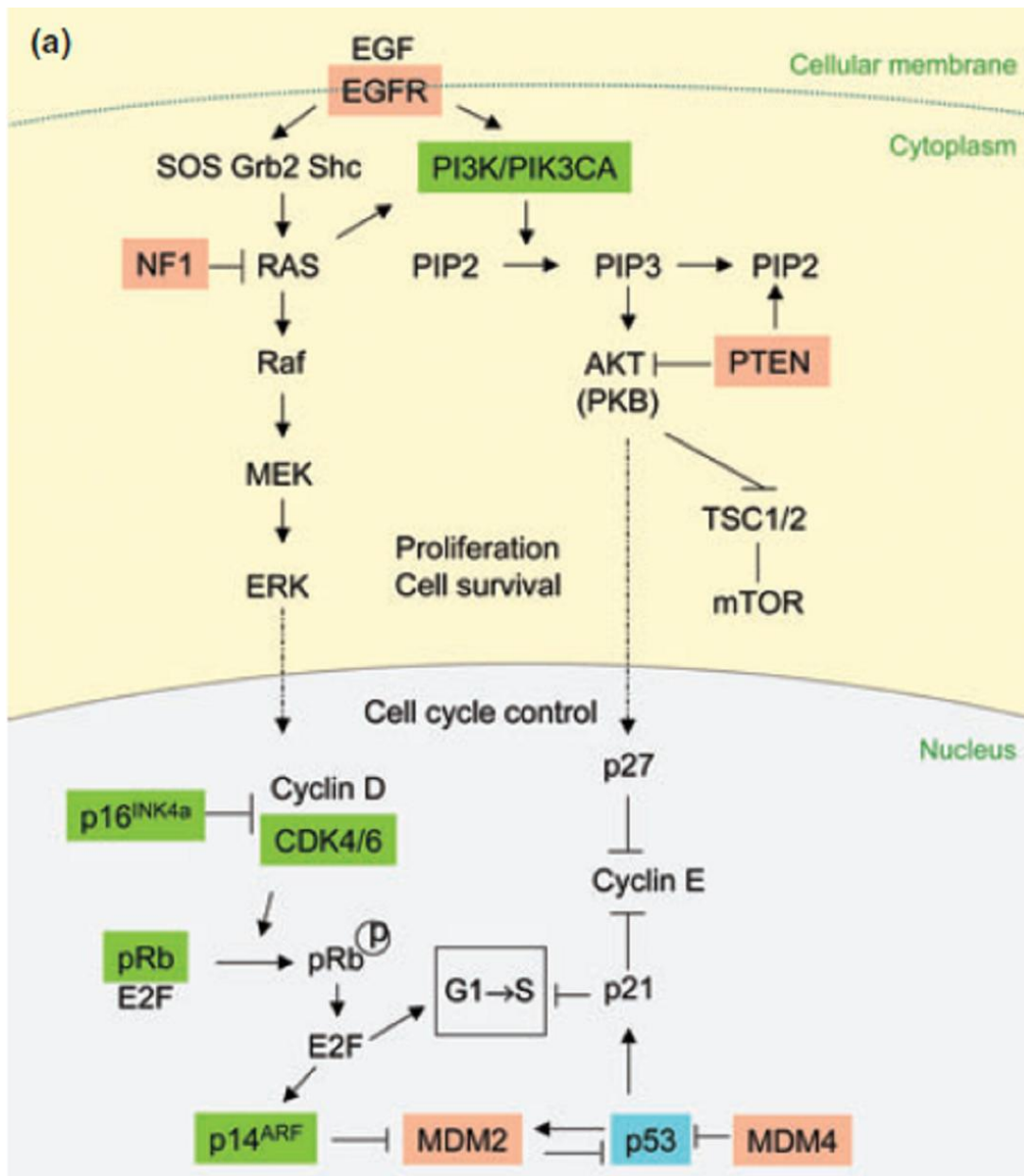


Figura 3. Principais vias de sinalização envolvidas na patogênese dos glioblastomas multiforme. Ohgaki & Kleihues, 2009.

Outra característica importante que os GBMs apresentam, é a perda da região 10q22-25, porção cromossomal que carrega importantes genes supressores tumorais, entre os quais o PTEN (*phosphatase and tensin*

homologue deleted from chromosome 10). A perda da expressão da PTEN resulta em ativação da AKT, uma das vias centrais de sobrevivência celular, que dessa forma torna-se constitutivamente ativa, impedindo a sinalização à morte celular apoptótica. O nível de expressão da PTEN está inversamente relacionado com a malignidade dos gliomas: quanto maior a expressão desta proteína, menos maligno é o tumor, sendo que GBMs apresentam PTEN mutada ou deletada, o que sugere que PTEN ocupa um papel decisivo na gliomagenese (Koul et al., 2008). A soma de todas essas alterações contribui para a principal característica dos GBMs: sua proliferação descontrolada. A Figura 3 apresenta as principais alterações genéticas dos gliomas de diferentes graus.

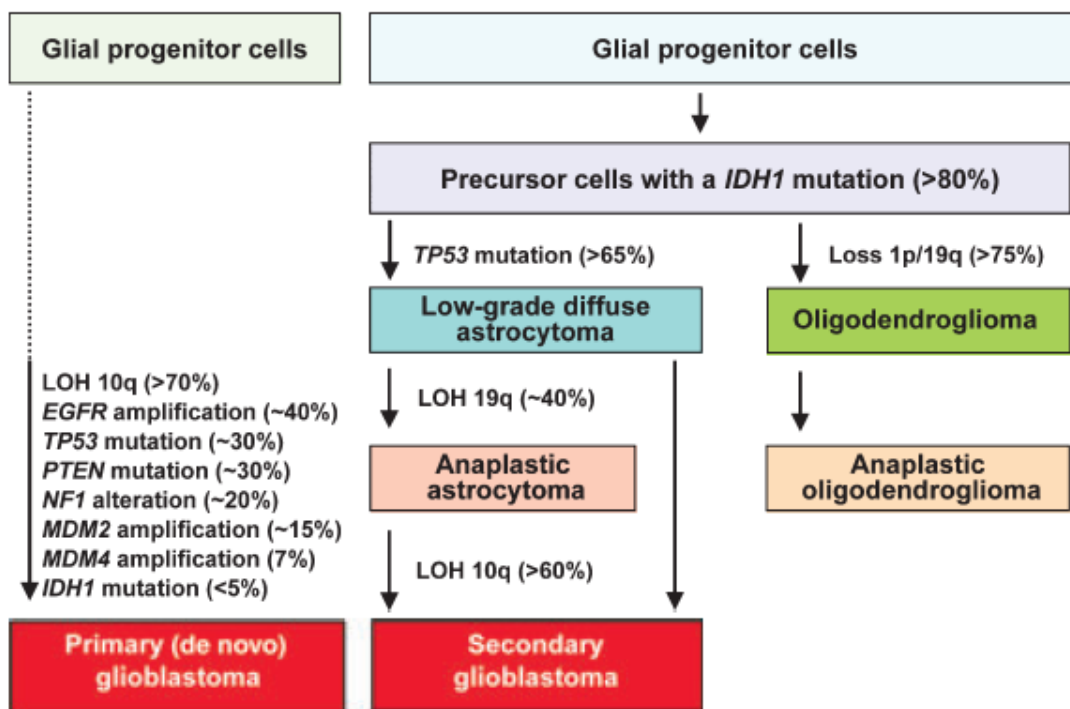


Figura 4. Principais alterações genéticas nos gliomas de diferentes graus. Ohgaki & Kleihues, 2009.

Além disso, dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o metabolismo extracelular das purinas encontra-se alterado em células de GBM, sugerindo que alterações no sistema purinérgico podem ser uma característica dos gliomas que podem contribuir para o seu fenótipo de malignidade (Wink et al., 2003; Bavaresco et al., 2008; Braganhol et al., 2009).

2. Inflamação

O processo inflamatório é uma reação complexa a agentes nocivos, como células danificadas, geralmente necróticas, que consiste de respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas, fazendo-se presente na maioria das patologias. Apresenta-se como um mecanismo de defesa do organismo, cujo objetivo é a eliminação da causa inicial da lesão celular. Dessa forma, o processo inflamatório pode ser definido como uma sequência de eventos que ocorrem em resposta a estímulo nocivo, trauma ou infecção (Robbins & Cotran, 1999, Ader et al., 2006). Essa resposta envolve uma ação coordenada entre os mediadores da inflamação e as células inflamatórias (Sacca et al., 1997).

O processo é, de acordo com um dos princípios básicos da patologia, em grande parte o resultado do aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos (Majno, 1961). Desencadeia-se pela liberação de mediadores químicos originados nos tecidos lesionados e pelas células migratórias. Dentre os principais mediadores figuram a histamina, as proteases plasmáticas, os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), o fator ativador de plaquetas, as interleucinas, o óxido nítrico, os constituintes lisossômicos dos leucócitos e as espécies reativas de oxigênio (Calixto et al., 2000). As citocinas representam um grupo de substâncias multifuncionais que estão envolvidas nos principais pontos da resposta inflamatória. Até o momento, mais de 100 membros das famílias das citocinas e seus respectivos receptores foram identificados (Barnes, 2001; Haddad, 2002). De uma forma geral, citocinas podem ser classificadas como pró ou anti-inflamatórias, dependendo do momento da inflamação que irão interferir (Hopkins, 2003). Numa visão simplificada, citocinas próinflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-18, estão envolvidas na iniciação e amplificação do processo inflamatório, enquanto citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- β , modulam negativamente esses eventos (Dinarello, 2000; Opal et al., 2000).

A ativação de células por diversos estímulos causa remodelação de seus lipídios de membrana para gerarem mediadores lipídicos biologicamente ativos, que afetam diversos processos biológicos, incluindo a inflamação. O ácido araquidônico encontra-se esterificado nos fosfolipídios de membrana,

sendo liberado através da ação das fosfolipases celulares. (Robbins & Cotran, 1999). Os sinais bioquímicos envolvidos na ativação de fosfolipase incluem aumento de Ca^{2+} citoplasmático e a ativação de várias cinases em resposta a estímulos externos. Os metabólitos do ácido araquidônico são sintetizados por duas classes principais de enzimas: as ciclooxigenases (prostaglandinas e tromboxanos) e as lipoxigenases (leucotrienos e lipoxinas). Dessa forma, a via da ciclooxigenase (COX), iniciada por duas enzimas diferentes (a COX-1, constitutivamente expressa e a COX-2, uma enzima induzida), leva à geração de prostaglandinas (Gray et al., 2002).

A ciclooxigenase é uma glicoproteína dimérica integral da membrana, encontrada predominantemente no retículo endoplasmático. Tanto a COX-1 quanto a COX-2 consistem num longo canal estreito, hidrofóbico e com massa molecular de 71 kDa (Gray et al., 2002). Diante de um trauma tissular, o acúmulo local de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores químicos ocasionam a sensibilização periférica da dor, que se caracteriza por uma alteração no limiar de nociceptores, com conseqüentes hiperalgia e/ou alodínia (Sakata & Issy, 2008).

3. Anti-inflamatórios não-esteróides

Os anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) têm sido utilizados, por mais de 100 anos, no tratamento de diversas doenças; embora exista um limite na duração da terapia devido aos efeitos colaterais que desencadeiam (Kontogiorgis et al., 2002). São fármacos amplamente prescritos, existindo atualmente mais de 50 compostos deste grupo disponíveis no mercado. Têm emprego no tratamento da dor e das inflamações associadas a diversas síndromes dolorosas (Sakata & Issy et al., 2008). Os AINEs são fármacos com propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias, sendo que sua principal vantagem é a ausência de dependência física ou psíquica, com o uso prolongado, quando comparados aos opióides (Alsalameh et al., 2003). A ação anti-inflamatória dos AINEs decorre principalmente da inibição da enzima COX, impedindo, dessa forma, a formação de prostaglandinas e de tromboxanos, mediadores do processo inflamatório (Burian & Geisslinger, 2005).

A utilização clínica dos AINEs está intimamente relacionada ao tratamento de doenças articulares como artrite reumatóide, artrite gotosa, osteoartrite, tendinite, além de outros processos inflamatórios em geral como lesões músculo-esqueléticas e inflamações oftálmicas (Vane & Botting, 1996). Seu uso costuma ser indicado nos casos em que a morbidade da reação inflamatória supera os benefícios de regeneração tecidual causados pela inflamação. Quando utilizados por períodos prolongados, por exemplo, doenças inflamatórias crônicas, os AINEs geralmente causam efeitos adversos como toxicidade gástrica, disfunção hepática e renal além de reações cutâneas, o que embasa o interesse no desenvolvimento de alternativas para administração destes fármacos (Guterres et al., 2000; Tomisato et al., 2004). A maioria dos AINEs são ácidos orgânicos e atuam como inibidores competitivos reversíveis da atividade da COX (Botting et al., 2006).

A enzima ciclooxigenase possui, atualmente, três isoformas conhecidas: COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, incluindo plaquetas e estômago, estando envolvida na sinalização entre células e na homeostasia tecidual. A COX-2 é induzida principalmente nas células inflamatórias, quando estas são ativadas durante a inflamação, entretanto, no cérebro, rins e alguns outros tecidos, a COX-2 é expressa constitutivamente (Deninger & Schluesener, 1999). Por sua vez, a COX-3 é uma variante do gene da COX-1, através da ocorrência de um *splicing* alternativo. Sabe-se que esta isoforma é mais abundante no coração e no córtex cerebral, porém esforços vêm sendo realizados a fim de se obter maiores informações a respeito de sua função e modulação (Cui et al., 2004; Botting et al., 2006).

Embora todos os AINEs apresentem ação antipirética, analgésica e anti-inflamatória, existem diferenças em suas atividades individuais. Os motivos para estas diferenças entre os AINEs não estão totalmente esclarecidos, mas provavelmente estão relacionados às suas diferenças de especificidade sobre as isoformas de COX, bem como pelos mecanismos de ação secundários ainda desconhecidos (Bernardi, 2009). Além disso, estudos recentes com linhagens de células tumorais, estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado a potencial utilização dos AINEs como agentes farmacológicos no tratamento e prevenção de vários tipos de câncer (Toomey et al., 2009; Harris,

2009; Hyde & Missailidis, 2009). Sugere-se que a expressão de COX-2 possa ser constitutiva em vários tipos de tumores, sendo que a superexpressão dessa enzima está associada com gliomas clinicamente mais agressivos e de pior prognóstico para o paciente (Shono et al., 2001). Apesar de os mecanismos moleculares envolvidos não estarem ainda bem definidos, acredita-se que a COX contribua para produção de fatores pró-angiogênicos e que o aumento de sua expressão durante a tumorigênese seja provavelmente consequência de múltiplos efeitos (Howe et al., 2001).

3.1. Indometacina

A indometacina é um fármaco derivado do ácido indolacético, de nome químico [1-(4-clorobenzoil)-5-metóxi-2-metilindol-3-il]acético (Figura 5). Apresenta-se como pó cristalino, inodoro, de coloração branco-amarelada (Reynolds, 1993). A indometacina pertence à classe dos AINEs, apresentando potente ação antiinflamatória além de ação analgésica e antipirética. Foi introduzida na terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias reumáticas, principalmente artrite reumatóide, osteoartrite e espondilite anquilosante. A dose comumente empregada por via oral situa-se entre 25 a 50 mg (o que corresponde a faixa de 5 - 10 mg/Kg em animais), com intervalos de 8 horas, sendo a dose máxima diária de 200 mg. A indometacina também tem sido usada em recém nascidos por via intravenosa nas doses de 0,1 a 0,2 mg/Kg a cada 12 horas com a finalidade de fechamento do ducto arterioso persistente (Wannamacher e Ferreira, 2004).

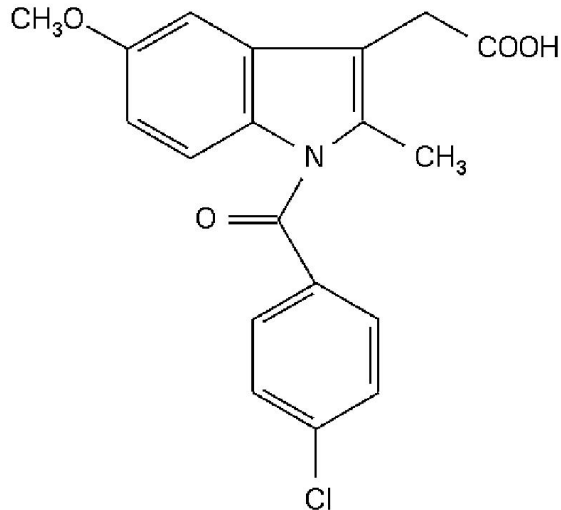


Figura 5. Estrutura molecular da Indometacina

A absorção da indometacina após administração oral é rápida, sendo o pico de concentração plasmática alcançado após aproximadamente 2 horas. A biodisponibilidade cerebral da indometacina é baixa, pois aproximadamente 90% do fármaco administrado liga-se a proteínas plasmáticas, o que reduz a fração livre do fármaco na circulação e dificulta a passagem pela BHE (Parepally et al., 2006).

A atividade anti-inflamatória da indometacina é mediada tanto pela inibição de ambas isoformas da COX, quanto pela inibição da migração dos neutrófilos (Jacobs & Bijlsma, 1997; Peskar, 2001). Em função de seu efeito inibitório sobre a COX-1, a indometacina apresenta importantes efeitos adversos dose-dependente que, portanto, restringem sua utilização apenas a doenças inflamatórias graves, onde alternativas terapêuticas não são efetivas. Sua toxicidade está relacionada principalmente ao trato gastrointestinal, local em que pode provocar ulcerações e até mesmo perfurações e hemorragias. Tem sido descrito que não apenas esse efeito sistêmico de inibição das COXs, mas também um efeito citotóxico pelo contato direto do fármaco à mucosa gástrica seria o responsável pelas lesões gastrointestinais. A irritação local causada pelo contato direto dos AINEs à mucosa gástrica está relacionada com a ionização do fármaco. A indometacina é um ácido orgânico fraco e em pH baixo está na forma não ionizada, o que possibilita uma alta solubilidade em

lipídeos, comprometendo a integridade da mucosa pela redução da hidrofobicidade da superfície. Ao penetrar na membrana celular e acumular-se no epitélio da mucosa gástrica, onde o pH local é 7,4, o fármaco apresenta-se na forma ionizada sendo absorvido (Reynolds, 1993; Fiorucci & Antonelli, 2001). Além disso, a inibição de prostaglandinas renais protetoras contra os efeitos vasoconstritores de angiotensina e catecolaminas pode agravar disfunções renais pré-existentes e causar insuficiência renal, tornando necessária a interrupção do tratamento para a reversão do quadro clínico (Tomisato et al., 2004). Dessa forma, a principal limitação do emprego terapêutico da indometacina são os seus efeitos adversos.

Recentemente, estudos experimentais sugeriram novas aplicações terapêuticas para a indometacina. Demonstrou-se que, em células de glioma, a indometacina modula a expressão de proteínas da matriz extracelular (Ishibashi, et al., 2005) e diminui a capacidade de invasão das células (Wang et al., 2005). Adicionalmente, resultados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a indometacina exerce efeito antiproliferativo em linhagens celulares de gliomas por induzir uma parada na progressão do ciclo celular (Bernardi et al., 2006) e por modular a atividade e expressão de enzimas do sistema purinérgico (Bernardi et al., 2007). Nosso grupo de pesquisa demonstrou também, com sucesso, uma nova abordagem para o tratamento de gliomas baseada na administração da indometacina nanoencapsulada. Os resultados evidenciaram que nanocápsulas de indometacina podem ser consideradas promissoras para o tratamento de gliomas, sendo mais efetivas que o fármaco em solução, sem apresentarem os efeitos colaterais da quimioterapia (Bernardi *et al.*, 2008).

Com a finalidade de reduzir os efeitos tóxicos da indometacina uma alternativa interessante é a modificação de seu grupamento ácido por esterificação ou amidação objetivando reduzir a irritação da mucosa gástrica por ação local do fármaco (Bonina et al., 1997; Kalgutkar et al., 2000; Cruz et al. 2006). Outra estratégia é a introdução do fármaco em sistemas carreadores, como lipossomas (Srinath et al., 2000), microesferas lipídicas (Srinath e Diwan, 1998) ou nanopartículas (Ammoury et al., 1991; Calvo et al., 1996; Kim et al., 2001; Pohlmann et al., 2002). Esses sistemas possibilitam a redução dos efeitos adversos, tanto por minimizar o contato do fármaco com a mucosa

gástrica, como por proporcionar sua vetorização para o local de ação, além de promover, em certos casos, o aumento da absorção no trato gastrointestinal (Fawaz et al., 1996; Srinath & Diwan, 1998).

A liberação do fármaco a partir de sistemas nanoparticulados depende dos fenômenos de dessorção do fármaco da superfície das partículas, da difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas, da difusão através da parede polimérica das nanocápsulas, da erosão da matriz polimérica ou da combinação dos processos de difusão e erosão (Soppimath et al., 2001). Uma reação interfacial foi desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa como uma nova abordagem para determinar o perfil de liberação de fármacos a partir de nanocápsulas poliméricas (Pohlmann et al., 2004). Esta estratégia foi utilizada para comparar nanocápsulas poliméricas contendo indometacina daquelas que continham o pró-fármaco. Os resultados mostraram que o mecanismo de associação é diferenciado dependendo da substância associada, sendo que a indometacina encontra-se predominantemente adsorvida às nanocápsulas enquanto que o seu éster etílico encontra-se predominantemente associado ao núcleo oleoso da nanocápsula. Dessa forma, a esterificação da indometacina acarreta uma modificação do seu perfil de liberação, uma vez que diferentes magnitudes de tempo são requeridas para a liberação total da indometacina e seu éster a partir das nanocápsulas (Cruz et al., 2006). Bernardi e colaboradores (2008) estudaram o efeito da indometacina e do éster etílico de indometacina simultaneamente encapsulados sobre a proliferação celular de células de glioma, e mostraram a existência de sinergismo entre as duas substâncias. Provavelmente, a indometacina é responsável por um efeito antiproliferativo inicial que é mantido e sustentado pela liberação mais lenta do éster etílico de indometacina das nanocápsulas. Além disso, estudos demonstraram que o éster etílico de indometacina *in vivo* é convertido em indometacina assim que liberado das nanocápsulas independentemente da via de administração (Cattani et al., 2008).

4. α -bisabolol

O α -(-)- bisabolol (Figura 6) é um pequeno álcool sesquiterpeno oleoso com massa molecular de 222,37 Da; amplamente utilizado em fragrâncias e preparações cosméticas devido a sua característica não-alérgica (Madhavan, 1999). Esse composto oleoso apresenta um odor floral doce e é frequentemente encontrado em várias plantas, incluindo a camomila (*Matricaria chamomilla*). Em 1951, Isaac e colaboradores isolaram este composto das sumidades floridas da camomila, sendo que, o óleo essencial desta planta contém até 50 % de α -bisabolol, molécula considerada o principal contribuinte para o efeito antiinflamatório da camomila (Jakovlev et al., 1969, 1979).

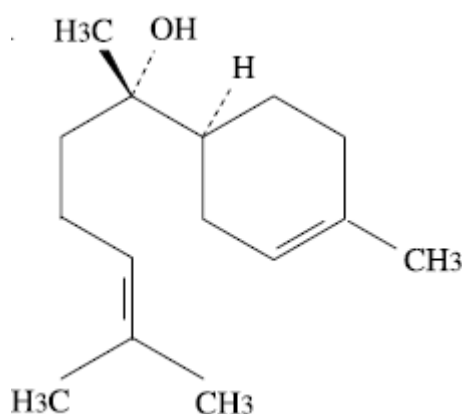


Figura 6. Estrutura molecular do α -bisabolol.

É uma substância vastamente conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias (Thiele et al., 1969; Jakovlev et al., 1979), inclusive no tratamento da artrite, e por sua habilidade de aumentar a penetração transepidérmica de fármacos (Kadir & Barry, 1991). Os compostos sesquiterpenos, como o α -bisabolol parecem ser bons inibidores da 5-lipoxigenase (5-LOX), apresentando valores de IC_{50} sobre a 5-LOX entre 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ (Baylac et al., 2003).

Estudos demonstraram as propriedades antibacterianas e antifúngicas do α -bisabolol, além da capacidade em prevenir o desenvolvimento de úlceras gástricas (Szelenyi et al., 1979). Devido a sua atoxicidade em animais (LD_{50} 13-14 g/kg) (Budavari et al., 1996) é amplamente utilizado em preparações

cosméticas, inclusive para o tratamento de dermatites (Grassi et al., 2000). Entretanto, são escassos os trabalhos científicos que versam sobre seus efeitos biológicos (Hernandez-Ceruelos et al., 2002; Villegas et al., 2001).

O bisabolol é um composto lipofílico que apresenta tendência a oxidação. Os produtos de oxidação são essencialmente dois óxidos de bisabolol, os quais apresentam atividade anti-inflamatória 50% inferior a substância de origem (Schilcher, 1987). Um aumento da estabilidade dos óleos da camomila frente à oxidação foi demonstrado quando estes foram complexados com ciclodextrinas (Szejtli et al., 1980; Thoss et al., 1994).

O α -bisabolol possui um potente efeito citotóxico tempo e dose-dependente sobre linhagens celulares malignas de glioma de rato e de humano, induzindo rapidamente a apoptose, sem demonstrar efeitos tóxicos nas células normais (Cavaliere et al., 2004). Sua atividade citotóxica frente a linhagens celulares de carcinoma pancreático foi também demonstrada (Darra et al., 2008). Darra e colaboradores descreveram que o α -bisabolol pode ser rapidamente incorporado em *rafts* lipídicos: domínios de membrana altamente dinâmicos e enriquecidos com esterol e esfingolipídeos, que desenvolvem importante papel no transporte de proteínas intracelular e fusão de membrana. Quanto a isto, tem sido relatado que as membranas plasmáticas de células tumorais contêm muito mais *rafts* lipídicos que as membranas plasmáticas de células normais (Patra & Bettuzzi, 2007). Recentemente, Cavaliere e colaboradores (2009), buscando investigar o mecanismo de morte envolvido, sugeriram que esta toxicidade está intimamente relacionada a sua concentração intracelular. Uma análise das concentrações intracelulares de α -bisabolol em células de glioma de linhagem humana mostrou que ele é rapidamente distribuído em frações na membrana, citosol e núcleo, enquanto que as mesmas condições impostas a fibroblastos indicou uma distribuição intracelular bastante baixa. Os resultados sugerem que uma vez absorvido em *rafts* lipídicos de membrana é rapidamente transportado para o interior da célula. Os estudos demonstraram também que o consumo de oxigênio em célula tumoral exposta a 5 μ g de α -bisabolol durante 20 minutos foi 50 % menor. Quando a mesma concentração foi utilizada sobre fibroblastos, observou-se que durante 40 minutos de incubação não ocorreu nenhuma

diminuição no consumo de oxigênio. A ciclosporina A (CsA), um inibidor específico da abertura de poro de permeabilidade mitocondrial (mPTP), foi capaz de abolir o efeito tóxico do α -bisabolol sobre a respiração celular em células de glioma de linhagem humana T67, sugerindo que seu efeito está dessa forma, diretamente relacionado a abertura de poros na membrana mitocondrial (Cavalieri et al., 2009).

Devido ao seu caráter lipofílico, o α -bisabolol apresenta baixa solubilidade em fluídos biológicos. No tratamento de neoplasias do SNC, uma substância potencial deve apresentar baixa toxicidade, suficiente solubilidade no sangue para estar biodisponível e suficiente lipofilicidade para atravessar a barreira hematoencefálica. Para aumentar a hidrofiliicidade do α -bisabolol, o que influenciaria em suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas (Martínková, 2001) a glicosilação da molécula foi proposta, de forma a aumentar a permeabilidade através de barreiras biológicas (Poduslo and Curran, 1994; Egleton et al., 2001). Como resultado, foi observado aumento na atividade citotóxica frente a linhagens celulares de glioma quando comparado ao α -bisabolol (obtiveram IC_{50} entre 40- 64 μ g para os compostos preparados) e uma maior adequação aos parâmetros físico-químicos necessários para atravessar passivamente a BHE (Piochon et al., 2008).

5. Nanopartículas

5.1 Nanobiotecnologia

A fusão de duas abordagens tecnológicas recentes, a biotecnologia e a nanotecnologia, representa a nanobiotecnologia, que apresenta enormes inovações e potencialidades. Nos últimos anos, um considerável interesse tem sido dado aos materiais biodegradáveis nanoestruturados para aplicações em diversas áreas biomédicas, como carreadores de fármacos, biossensores, biomarcadores e imagens moleculares (Sahoo et al., 2003; Emerich & Thanos, 2006). Áreas importantes da nanobiotecnologia incluem a nanomedicina (biologia molecular e genética), a física-médica (diagnóstico), o desenvolvimento de nanomedicamentos (fármacos encapsulados), além da

nanocosmecêutica (cosméticos com efeitos farmacológicos consideráveis). De forma bastante relevante, a nanobiotecnologia se mostra promissora em aumentar a aplicabilidade terapêutica de fármacos.

Na área farmacêutica de liberação de fármacos, os principais objetivos dos estudos envolvendo carreadores concentram-se em aumentar o controle de liberação, a especificidade e a seletividade ao local de ação do fármaco, bem como a diminuição da dose e dos efeitos colaterais (Barrat et al., 2000; Couvreur et al., 2002).

5.2. Sistemas carreadores de fármacos

A resposta farmacológica de um fármaco está diretamente relacionada à sua concentração no sítio de ação. Como a distribuição das moléculas no organismo está diretamente relacionada com suas propriedades físico-químicas, a associação de fármacos a sistemas carreadores tem sido considerada uma alternativa, visando o controle de sua distribuição no organismo (Couvreur et al., 2002).

O controle de liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores capazes de permitir a otimização da velocidade de entrega e do regime de dosagem das substâncias têm sido uma área de muito interesse. Dentre esses carreadores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas). As nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis atraem maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade tanto nos fluídos biológicos quanto durante o armazenamento (Benoit et al., 1986; Pusieux et al., 1994; Soppimath et al., 2001; Schaffazick et al., 2003).

Carreadores coloidais de fármacos como lipossomas, complexos lipídicos, nanoemulsões, nanoesferas e nanocápsulas, apresentam-se como veículos promissores para administração intravenosa de fármacos lipofílicos, bem como para administração nas vias oral, ocular, cutânea e oftálmica (Alvarez-Róman et al., 2001; Fattal & Vauthier, 2002; Couvreur et al., 2002). A vetorização em órgãos, tecidos ou células específicas apresenta como vantagem a diminuição de efeitos adversos apresentados sistemicamente pelo

fármaco não vetorizado (Guterres et al., 2001). Outro aspecto importante é a possibilidade de diminuição das doses e do número de aplicações, de modo que os pacientes apresentam maior adesão ao tratamento. Além disso, em alguns casos, o nanoencapsulamento pode ter como objetivo a melhora da biodisponibilidade de um fármaco através do aumento da estabilidade desse fármaco nos fluídos biológicos ou ainda o aumento de estabilidade da própria formulação farmacêutica (Couvreur et al., 2002; Couvreur & Vauthier, 2006).

Sistemas nanoestruturados para o carreamento de fármacos têm sido propostos com destaque para compostos antitumorais, peptídeos, proteínas, vacinas, oligonucleotídeos e agentes anti-infecciosos (Couvreur & Vauthier, 2006; Mora-Huertas, 2010).

5.2.1. Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas podem ser definidas como sistemas coloidais que apresentam diâmetros inferiores a 1 µm e diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural. As nanopartículas podem consistir de uma matriz polimérica, onde o fármaco pode estar retido ou adsorvido, sem apresentar óleo na sua composição, constituindo as nanoesferas, ou de um invólucro polimérico disposto sobre um núcleo oleoso, constituindo as nanocápsulas, de forma que neste caso, o fármaco pode estar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Soppimath et al., 2001; Schaffazick et al., 2003; Álvarez-Román et al., 2004). Devido as suas características peculiares, as nanocápsulas podem ser consideradas um sistema “reservatório” (Couvreur et al., 2002).

Os materiais poliméricos são extensivamente utilizados no encapsulamento de fármacos, apresentando-se como uma alternativa para mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas da substância, melhorar sua interação com membranas, bem como o transporte através delas e facilitar sua absorção ou penetração cutâneas (Couvreur & Vauthier, 2006). Além disso, as nanopartículas poliméricas permitem modificações químicas na sua superfície, possibilitando um controle farmacocinético na vetorização de agentes terapêuticos (Faraji et al., 2009).

Comparadas com outros carreadores coloidais, as nanopartículas poliméricas apresentam maior estabilidade quando estão em contato com fluídos biológicos (Roney et al., 2005). Uma vez que possuem diâmetros bastante inferiores a 5 μm , diâmetro dos capilares do organismo, as nanopartículas podem ser administradas por via intravenosa (Hans & Lowman, 2002). Contudo, quando administradas por essa via, a superfície hidrofóbica da maioria das nanopartículas determina a sua adsorção por proteínas (opsonização) e posterior fagocitose por células do sistema imunológico. No entanto, estratégias de modificação de superfície das nanopartículas propiciaram o desenvolvimento de nanopartículas furtivas, que são caracterizadas por permanecer longo tempo na circulação sem serem fagocitadas (Brigger et al., 2002).

Dentre os polímeros empregados para a preparação de nanopartículas, destaca-se a poli(ϵ -caprolactona) devido a suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas. Por ser um polímero semi-cristalino, apresenta um perfil de degradação mais lento quando comparado aos polímeros amorfos e constitui um dos mais importantes polímeros biodegradáveis com emprego na medicina (Guterres et al., 2007; Lu & Chen, 2004). Além disso, por ser um poliéster, apresenta alguma propriedade bioadesiva, o que confere um acréscimo na deposição das partículas na mucosa do trato gastrointestinal, aumentando assim a absorção sistêmica de fármacos (Lamprecht et al., 2000a). Desta forma, vários trabalhos têm demonstrado a importância da utilização deste material polimérico no desenvolvimento de sistemas carreadores nanoparticulados de fármacos (Lamprecht et al., 2000a; 2000b; Sinha et al., 2004; Lu & Chen, 2004; Fattal et al., 2007), sendo estes empregados inclusive para uso intravenoso (Ravi Kumar, 2000).

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas por diversos métodos desenvolvidos nos últimos 30 anos. De uma forma geral, esses métodos podem ser classificados em duas categorias principais, levando em consideração se a formação das nanopartículas requer uma reação de polimerização (polimerização *in situ*) ou se estas são formadas diretamente utilizando um polímero pré-formado (Couvreur et al., 1995; Couvreur et al., 2002; Fattal & Vauthier, 2002; Schaffazick et al., 2003; Soppimath et al., 2001;

Pinto Reis et al., 2006). Dentre esses, destaca-se para a preparação de nanocápsulas o método de deposição interfacial de polímeros pré-formados seguido por evaporação do solvente proposto por Fessi e colaboradores (1989), considerado um método simples, baseado na precipitação de polímeros, evitando a presença de monômeros residuais potencialmente tóxicos na formulação obtida, pelo qual se obtêm partículas com diâmetros médios situados entre 200 e 500 nm.

Para a formação da dispersão coloidal das partículas de polímero e a indução da separação de fases é utilizado um sistema solvente/não solvente totalmente miscível. Dessa forma, as partículas formam-se espontaneamente e praticamente instantaneamente. No processo, o polímero, o fármaco, o constituinte oleoso e opcionalmente um tensoativo lipofílico são dissolvidos em um solvente semi-polar solúvel em água. Essa solução é injetada em uma solução aquosa contendo um tensoativo sob agitação magnética. Assim, o óleo encontra-se disperso na mistura solvente/não-solvente e o polímero deposita-se ao redor da gotícula formada. As nanocápsulas possuem amplo emprego no encapsulamento de fármacos lipossolúveis (Schaffazick et al., 2003), estando o fármaco, no caso, geralmente dissolvido na fase interna oleosa ou adsorvido ao polímero (Couvreur et al., 2002).

A vantagem da utilização desse método é a obtenção espontânea, simples, eficiente e reproduzível de pequenas partículas em escala nanométrica com elevada capacidade de encapsulação de fármacos (Fessi et al., 1989; Schaffazick et al., 2003; Guterres et al., 2007). Dentre os fatores que determinam o diâmetro da partícula a ser obtida estão a concentração do polímero e do fármaco, a quantidade de tensoativo, a concentração de óleo na fase orgânica e velocidade de difusão da fase orgânica sobre a aquosa (Couvreur et al., 2002).

5.3. Vetorização de fármacos antitumorais

Considerando a totalidade de vantagens apresentadas pelos sistemas nanoparticulados, a vetorização de fármacos antitumorais encontra-se entre as suas mais promissoras aplicações biológicas. A nanotecnologia possui potencial para revolucionar o diagnóstico e a terapia do câncer (Peer et al.,

2007). Dentre as neoplasias, os tumores sólidos apresentam um maior desafio para a quimioterapia convencional (Wong et al., 2007), pois apresentam particularidades que se tornam obstáculos para uma terapia efetiva. Essas particularidades incluem alterações bioquímicas, alterações nas vias de sinalização para apoptose e proliferação celular e o sistema de efluxo da glicoproteína P (Pgp) que é responsável pela resistência a fármacos (MDR - *multi-drug resistance*) (Krishna & Mayer, 2000). Em adição a esses mecanismos “celulares”, os tumores sólidos são mais resistentes à quimioterapia devido a mecanismos “não celulares” os quais são responsáveis pela dificuldade do fármaco em atingir concentrações farmacologicamente ativas na massa intratumoral (Bernardi, 2009). A vascularização nos tumores sólidos é caracterizada por ser irregular e tortuosa em algumas regiões. Além disso, os tumores sólidos apresentam aumentada pressão intersticial e baixa pressão microvascular que impede ou retarda o extravasamento de moléculas (Krishna & Mayer, 2000; Brigger et al., 2002). Dessa forma, o sistema linfático é ineficaz nos tumores sólidos (Wong et al., 2007).

A utilização de nanopartículas poliméricas para a vetorização de fármacos em tumores sólidos se deve principalmente a duas propriedades desses sistemas: 1) devido ao tamanho reduzido, nanopartículas são capazes de penetrar em pequenos capilares, aumentando eficientemente o acúmulo de fármaco na massa tumoral, apresentando o denominado “efeito de aumento de retenção e permeabilidade” (EPR); 2) o uso de polímeros biodegradáveis no preparo de nanopartículas, permite uma liberação sustentada do fármaco no sítio de ação por um período de dias ou semanas após a administração (Vinogradov et al., 2002). É importante considerar que o processo inflamatório presente nos tecidos adjacentes ao tumor também contribui para alterações de permeabilidade microvascular, facilitando o direcionamento das nanopartículas para o tecido tumoral. A Figura 7 representa de forma esquemática o acúmulo de nanopartículas no compartimento intersticial do tumor.

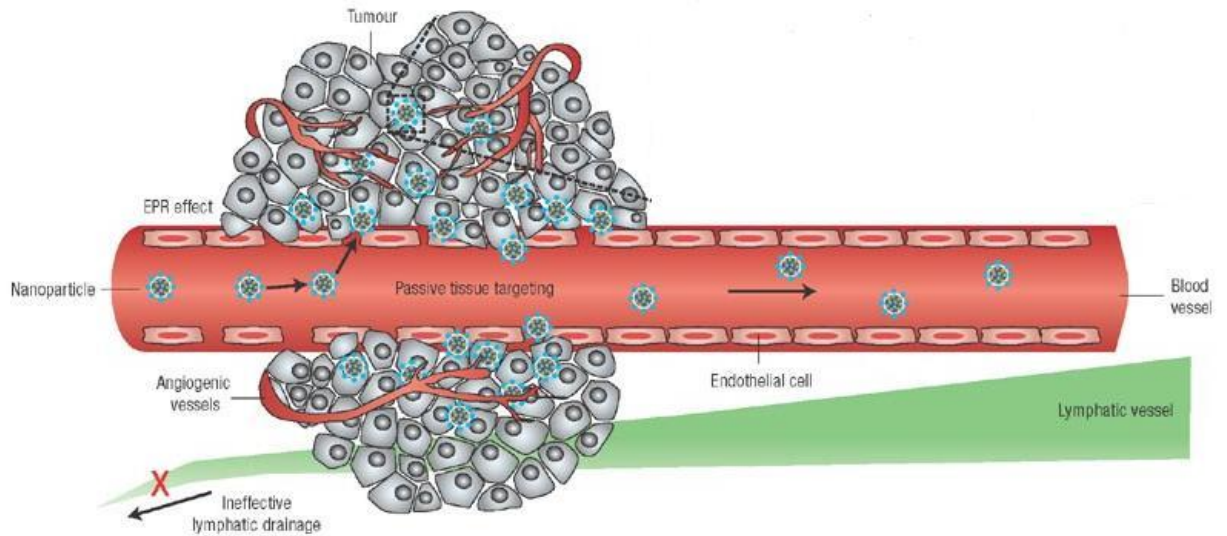


Figura 7. Acúmulo de nanopartículas pelo efeito de aumento de retenção e permeabilidade no interstício tumoral. Peer et al., 2007.

5.4. Vetorização de fármacos ao Sistema Nervoso Central

A terapêutica dos tumores cerebrais é desafiadora uma vez que este tecido beneficia-se de uma barreira muito eficiente, a barreira hematoencefálica (BHE). A BHE é a maior barreira para a passagem de substâncias ativas do compartimento sanguíneo ao cérebro, consistindo em uma monocamada de células endoteliais associadas a pericitos e astrócitos, que separam o parênquima cerebral do sistema circulatório, prevenindo assim a penetração de toxinas, patógenos e também de potenciais agentes terapêuticos (Béduneau et al., 2007). Apenas moléculas que apresentem tamanho inferior a 5.000 Da, sejam lipofílicas e eletricamente neutras conseguem difundir passivamente através da BHE (Abraham et al., 1994). As células endoteliais dos microvasos cerebrais apresentam características morfológicas importantes como a presença de *tight junctions* entre as mesmas, ausência de fenestrações e atividade pinocítica 100x reduzida quando comparada ao endotélio periférico, o que contribui para restringir a passagem de compostos para o sistema nervoso central (SNC) (Garcia-Garcia et al., 2005). A glicoproteína-P é também

presente na membrana plasmática luminal das células endoteliais, atuando como uma bomba de efluxo (Terasaki and Hosoya, 1999). Em condições de normalidade, a BHE atua beneficemente como uma barreira a entrada de agentes tóxicos resguardando a integridade cerebral. A Figura 8 apresenta de forma esquemática a anatomia da BHE.

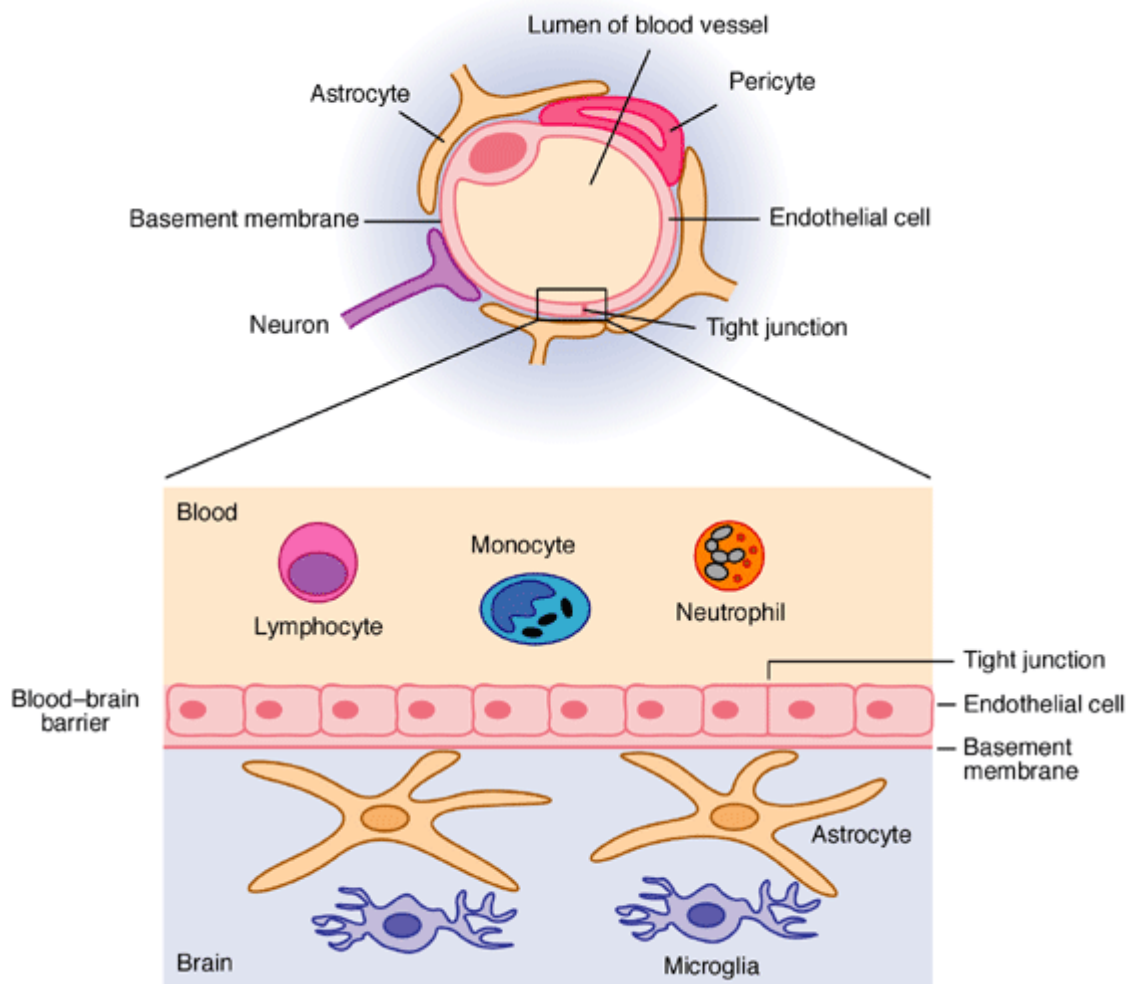


Figure 8. Anatomia da barreira hematoencefálica. Experts Reviews in Molecular Medicine, 2003.

Visando explorar a aplicabilidade de sistemas nanoparticulados para a vetorização de fármacos ao SNC, cada vez mais estudos têm sido realizados. (Juillerat- Jeanneret, 2008). Dentre os principais nanocarreadores descritos na literatura para esse propósito estão os lipossomas, as micelas poliméricas e as nanopartículas lipídicas ou poliméricas (Béduneau et al., 2007). As nanopartículas apresentam vantagens quando comparadas às terapias convencionais, por serem mais eficazes e pela possibilidade de uma

administração não-invasiva melhorando a qualidade de vida dos pacientes (Garcia-Garcia et al., 2005); entretanto, os mecanismos pelos quais as nanopartículas são capazes de atravessar a BHE ainda não são completamente compreendidos. Variáveis como o tamanho da partícula, o tipo de polímero, bem como as características físico-químicas da superfície são fundamentais para induzir uma estabilização estérica, aumentando assim o tempo de circulação, o que favorece a interação e penetração nas células endoteliais da BHE (Garcia-Garcia et al., 2005). Recentes estudos mostram que alterações na superfície das nanopartículas podem aumentar o transporte de fármacos através da BHE. Nanopartículas de doxorrubicina revestidas com polietilenoglicol (PEG) foram mais eficazes em reduzir o diâmetro tumoral em modelo de tumor cerebral quando comparado à doxorrubicina na forma convencional (solução) ou em nanopartículas não-revestidas (Petri et al., 2007). Além disso, o revestimento das nanopartículas poliméricas com polissorbato 80 (Tween 80[®]) foi relatado pela literatura como fundamental para a vetorização cerebral (Koziara et al., 2003; Ambruosi et al., 2006; Zhang et al., 2006). Uma possível explicação sustenta-se no fato de que o polissorbato 80 seletivamente promoveria a adsorção de certas proteínas plasmáticas, como a apolipoproteína E, na superfície das nanopartículas. Assim, as nanopartículas contendo apolipoproteína E adsorvida seriam reconhecidas como lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo transportadas pelas células endoteliais da BHE através de endocitose receptor-mediada (Calvo et al., 2001, Kreuter et al., 2002). As células endoteliais da BHE teriam um papel fundamental na vetorização cerebral através da adesão das nanopartículas com posterior endocitose, transcitose, modulação das *tight junctions* e inibição da glicoproteína P (Kreuter et al., 1995; Kreuter et al., 2003; Vauthier et al., 2003).

PARTE II
ARTIGO CIENTÍFICO

Selective cytotoxic effect upon glioma cells induced by nanocapsules
simultaneously containing α -bisabolol, indomethacin and its ethyl ester

Thatiana Terroso, Andressa Bernardi, Rudimar L. Frozza, Christianne Salbego,
Adriana R. Pohlmann, Ana M.O. Battastini and Silvia S. Guterres

Periódico: ***International Journal of Pharmaceutics***

Status: **a ser submetido**

As Figuras e Tabelas foram inseridas no corpo do trabalho para facilitar a leitura.

**Selective cytotoxic effect upon glioma cells induced by nanocapsules
simultaneously containing α -bisabolol, indomethacin and its ethyl ester**

Thatiana Terroso¹, Andressa Bernardi¹, Rudimar L. Frozza³, Christianne Salbego³, Adriana R. Pohlmann^{1,2}, Ana M. O. Battastini³ and Silvia S. Guterres^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* silvia.guterres@ufrgs.br

1. Introduction

Primary tumors of the central nervous system (CNS) are among the most prevalent solid tumors, representing one of the leading causes of cancer mortality before age 15 (Baylei et al., 1995). Among the various types of CNS tumors, the most common are gliomas, which, despite treatment, have early recurrence, which leads to a median survival of less than 12 months (Bondy et al., 2008). An alternative approach for the treatment of gliomas is the use of modified-release drug systems capable of increasing or even target the release of anticancer agents to the brain (Couvreur & Vauthier, 2006). Additionally, clinical and epidemiological studies have demonstrated the potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as pharmacological agents with a beneficial role in the treatment and prevention of various types of cancer. They also suggested the involvement of these drugs in the induction of apoptosis, in the control of invasion and proliferation of cells and in the inhibition of angiogenesis (Toomey et al., 2009; Harris, 2009; Hyde & Missailidis, 2009). Recently our research group demonstrated a promising approach, based on the nanoencapsulation of NSAIDs for the treatment of gliomas (Bernardi et al., 2008; Bernardi et al., 2009). The results showed that drug-loaded nanocapsules were more effective than a drug solution, without presenting the side effects of chemotherapy.

α -bisabolol is a oily sesquiterpene alcohol isolated from the essential oil from a variety of plants (Jakovlev et al., 1969, 1979). Studies revealed that α -bisabolol has a strong cytotoxic effect, time and dose dependent, on cell lines of highly malignant glioma in rats and humans, rapidly inducing apoptosis through mitochondrial pathway without showing toxicity to normal cells (Cavalieri et al., 2004).

Nanocapsules are vesicular systems in which the drug may be confined in an aqueous or oily cavity surrounded by a single wall polymer (Jäger et al., 2007), may be considered as a "reservoir" system (Brigger et al., 2002). It was reported that nanoparticles can be used as potential carriers of drugs through the blood brain barrier (Lockman et al., 2003; Koziara et al., 2003). Polysorbate-

80 coated nanoparticles can form steric hindrance to reduce macrophage cell adhesion, so they can be effectively targeted to the non-macrophage cells (Tobío et al., 1998; Kreuter et al., 2002). Many studies also indicated that polysorbate-80 coated nanoparticles can cross BBB (Koo et al., 2006). It was also reported that the conjugated polymer-anticancer drug compared to anticancer drugs of low molecular weight accumulate more in tumor tissue than in normal tissues, due to increased permeability and retention effect, and that this combination could prolong the pharmacological activity by releasing the drug at a controlled rate (Kim e Lee, 2001). Considering the effects recently demonstrated by our group and the potential cytotoxic effect of α -bisabolol, the aim of the present study was to prepare and investigate the effect of α -bisabolol-loaded nanocapsules on the glioma cell lines. Additionally, the effects of the co-nanoencapsulation of α -bisabolol and indomethacin, α -bisabolol and indomethacin ethyl ester and the association of these three drugs were also evaluated. The rationale for this proposal is to use α -bisabolol as a structural and active component of nanocapsules, allowing the simultaneous encapsulation of indomethacin and its ethyl ester in the same formulation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), minimum essential medium (MEM), HBSS, horse serum, Fungizone[®], penicillin/streptomycin, 0.25% trypsin/EDTA solution were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum was obtained from Cultilab (Cultilab, Campinas, SP, Brazil). Gentamicin was obtained from Schering do Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Indomethacin, dimethylsulphoxide, propidium iodide (PI) and MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) were obtained from Sigma (St. Louis, USA). Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Mw=65,000) was supplied by Aldrich (Strasbourg, France). α -bisabolol and indomethacin was obtained from Deg (Brazil). Span 60[®] (sorbitan monostearate) and Tween

80[®] (polysorbate 80) were obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Indomethacin ethyl ester was synthesized by our group (Cruz et al., 2006) after adapting the methodology described by Kalgutkar et al. (2000). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

2.2 Preparation of nanocapsules

Nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of polymer. At 40 °C, indomethacin (0.0054 g) and indomethacin ethyl ester (0.0046 g), poly(ϵ -caprolactone) (0.100 g), α -bisabolol (0.183 g) and sorbitan monostearate (0.065 g) were dissolved in acetone (27 ml). In a separate flask, polysorbate 80 (0.077 g) was added into 53 ml of water. The organic solution was poured into the aqueous phase under magnetic stirring at room temperature. After 10 min, acetone was eliminated and the suspensions concentrated under reduced pressure. The final volume was adjusted to 10 ml (Abisab/IndOH/IndOEt- NC). Additionally, a suspension containing both α -bisabolol (0.1830 g) and indomethacin (0.0054 g) (Abisab/IndOH- NC), a suspension containing α -bisabolol (0.1830 g) and indomethacin ethyl ester (0.0046 g) (Abisab/IndOEt- NC), a suspension containing only α -bisabolol (0.1830 g) (Abisab- NC) and a drug-unloaded suspension (NCB) was also prepared using the same method. Three batches for each formulation were prepared.

2.3 Characterization of nanocapsules

After preparation, the pH values of nanocapsule suspensions were determined using a potentiometer (Micronal B-474). The particle size, polydispersity and zeta potential of the systems were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Zetasizer[®] nano-ZS ZEN 3600 model (Malvern, UK). The samples were diluted with water (MilliQ[®]) (particle size) or in 10 mM NaCl aqueous solution (zeta potential). The measurements were made in triplicate. The particle size of Abisab/IndOH/IndOEt- NC was also determined

using a Nanosight®- Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). The total content of α -bisabolol, indomethacin or indomethacin ethyl ester in the formulations were measured by HPLC (Perkin-Elmer S-200, with injector S-200, detector UV-vis, a guard-column and a column Nova-Pak C-18, 150 mm, 4.9 mm, 4 μ m, Waters). The mobile phase for the indomethacin and indomethacin ethyl ester (0.8 ml/min) consisted of acetonitrile/water (70:30, v/v) and for the α -bisabolol consisted of acetonitrile/water (85:15, v/v) adjusted to apparent pH 5.0 ± 0.5 and 4.5 ± 0.5 respectively with 10 % (v/v) acetic acid. Each suspension (100 μ l) was treated with acetonitrile (10 ml), the solution was filtered (Millipore 0.45 μ m) and injected (20 μ l) for the indomethacin and indomethacin ethyl ester quantification. For the quantification of α -bisabolol each suspension (1 ml) was treated with water (10 ml) and an aliquot (100 μ l) was treated with acetonitrile (10 ml). The HPLC method was validated following the ICH (2005).

The morphological analysis of Abisab/IndOH/IndOEt- NC was conducted by transmission electron microscopy (TEM; Jeol, JEM 1200 ExII, Centro de Microscopia Eletrônica UFRGS) operating at 80 kV. For this analysis, the diluted suspension was deposited in Formvar-Carbon support film on specimen grid (Electron Microscopy Sciences) and negatively stained with 2 % (w/v) uranyl acetate solution. The Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulation was evaluated using multiple light backscattering by Turbiscan LAB® (Formulacion, France). The sample (20 mL) was poured into the glass cell without any dilution and analyzed at 30 °C using the scan mode for one hour. Through this analysis it is possible to identify phenomena of migration of droplet / particle as creaming and sedimentation, and phenomena of change in diameter as flocculation and coalescence.

2.4. Maintenance of cell lines

The human glioblastoma cell line U138-MG (derived from spontaneously occurring human malignant gliomas) and the rat glioma cell line C6 (derived from N-nitrosomethylurea-induced glioma in rat) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, USA). The cells were grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

containing antibiotics penicillin/streptomycin 0.5U/ml, and supplemented with 5% (C6) or 15% (U138-MG) (v/v) fetal bovine serum (FBS). Cells were kept at a temperature of 37 °C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air. All the experiments throughout this study were conducted in serum supplemented DMEM.

2.5. Drug exposure

α -bisabolol, indomethacin or indomethacin ethyl ester in solution was dissolved in cell culture-grade dimethylsulphoxide (DMSO; Sigma). The nanocapsules were prepared as described above. The glioma cells were plated according each experiment and after reaching subconfluence the cultures were exposed for 24 h to formulations: α -bisabolol, α -bisabolol/indomethacin, α -bisabolol/ indomethacin ethyl ester, α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester, Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC (25, 50, 75, 100 or 150 μ M). Control cells were treated with vehicle, i.e., 1.0 % of DMSO or with drug- unloaded nanocapsules. In cell counting and propide iodide assay, the cultures received 50 μ M of the nanocapsule formulations for 24 h. In the flow cytometry experiment and in the hippocampal organotypic cultures experiment, the cultures received 50 and 250 μ M of nanocapsules formulations for 24 h. Control cultures were performed without treatment.

2.6. Assessment of glioma cell viability

MTT assay provides a quantitative measure of cells containing metabolically active mitochondria and it is established on the mitochondrial reduction of a tetrazoliumbromide salt, MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide]), to a formazan product, whose absorbance can be determined by spectrophotometric measurement (Liu et al., 1997). Glioma cells were seeded in a 96-well plate at 1×10^3 per well and, after attained semi-confluence, the cultures were treated with 25, 50, 75, 100 or 150 μ M of α -

bisabolol, α -bisabolol/indomethacin, α -bisabolol/ indomethacin ethyl ester, α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester, Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC for 24 h. Control cultures were also treated with DMSO or drug-unloaded nanocapsules. After 24 h of treatment, each culture medium containing the drug was removed and the cells were washed twice with 100 μ l of PBS. After removing the PBS, 90 μ l of culture medium and 10 μ l of MTT were added to each of the wells. The cells were incubated for 3 h and the solution was then removed from the precipitate. The formazan crystal products were dissolved in 100 μ l of DMSO and the level of absorbance was read by an ELISA plate reader at 490 nm. This absorbance was linearly proportional to the number of live cells with active mitochondria.

2.7. Cell counting

The human glioma cells (U138-MG) were seeded at 1×10^4 cells per well in DMEM/15 % FBS in 24-well plates, and allowed to grow for 24 h. After reaching semi-confluence, glioma cells were treated with 50 μ M of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC for 24 h. Control cultures were treated with DMSO or drug-unloaded- nanocapsules. At the end of the treatment, the medium was removed. Cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and 200 μ l of 0.25 % trypsin/EDTA solution was added to detach the cells, which were counted immediately in a hemocytometer. The procedure was the same for the rat glioma cells (C6) except that they were seeded at 5×10^3 cells per well in DMEM/5 % FBS.

2.8. Propidium iodide assay

Glioma cell lines were treated 50 μ M of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC for 24 h. Control cultures were also treated with DMSO or drug- unloaded nanocapsules. After the end of treatment, glioma cells were incubated with 5 μ M of propidium iodide (PI) (Sigma Chemical) for 1 h. PI is excluded from healthy cells, but following loss of membrane integrity this molecule enters cells, binds to DNA and becomes

highly fluorescent (Macklis and Madison, 1990). PI fluorescence was excited at 515–560 nm using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE300) fitted with a standard rhodamine filter. Images were captured using a digital camera connected to the microscope.

2.9. Cell cycle analysis

For cell cycle analysis, 1×10^4 cells were plated in 12-well plates and, after 2 days, were treated with 50 or 250 μM of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC for 24 h. Control cultures were treated with DMSO or drug-unloaded- nanocapsules. At the end of the treatment, cells were trypsinized, centrifuged and resuspended in alysis buffer (3.5 mmol/L trisodium citrate, 0.1 % (v/v) Nonidet P-40, 0.5 mmol/L Tris-HCl, 1.2 mg/mL spermine tetrahydrochloride, 5 mg/mL RNase, 5 mmol/L EDTA, 1 mg/mL propidium iodide, pH 7.6), vortexed and incubated for at least 10 min on ice for cell lysis. DNA content was determined by flow cytometry. Ten thousand events were counted per sample. FACS analyses were performed in the Cell Quest Pro software (BD Biosciences, CA). The percentage of apoptosis was quantified from sub-G1 events.

2.10. Organotypic hippocampal slice cultures

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared according to the method of Stoppini et al. (1991). Briefly, 400- μm -thick hippocampal slices were prepared from 6- to 8-day-old male Wistar rats using a McIlwain tissue chopper (all animal use procedures were approved by local Animal Care Committee and were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) and separated in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) composed of (mM): glucose 36, CaCl_2 1.26, KCl 5.36, NaCl 136.89, KH_2PO_4 0.44, Na_2HPO_4 0.34, MgCl_2 0.49, MgSO_4 0.44, HEPES 25; Fungizone[®] 1% (Gibco, Grand Island, NY, USA) and gentamicine 36 $\mu\text{L}/100$ mL (Schering do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brazil); pH 7.2. The slices were placed on Millicell

culture insert (Millicell[®]-CM, 0.4 µm, Millipore[®], Bedford, MA, USA) and the inserts were transferred to a 6-well culture plate (Cell Culture Cluster, Costar[®], New York, NY, USA). Each well contained 1 ml of tissue culture medium consisting of 50% minimum essential medium (MEM) (Gibco), 25% HBSS (Gibco), 25% heat inactivated horse serum (Gibco) supplemented with (mM, final concentration): glucose 36, HEPES 25 and NaHCO₃ 4; Fungizone[®] 1% and gentamicine 36 µl/100 ml; pH 7.3. Organotypic cultures were maintained in a humidified incubator gasified with 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The medium was changed every 3 days and experiments were carried out after 14 days *in vitro* when the cells received 50 or 250 µM of the nanocapsule formulations. Control cells were organotypic cultures not exposed to formulations and neural cultures that had been exposed to oxygen glucose deprivation and then used as a positive control of cell damage.

2.11. Quantification of cellular death in organotypic hippocampal cultures

Cell death was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake (Norberg et al., 1999). After a period of 24 h in the presence of the different formulations, 5 µM PI was added to the cultures and incubated for 2 h. Cultures were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE300) using a standard rhodamine filter set. Images were captured and then analyzed using Scion Image software (<http://www.scioncorp.com>). The area where PI fluorescence was determined using the “density slice” option of Scion Image software and compared to the total hippocampus area to obtain the percentage of damage (Frezza et al., 2009).

2.12. Statistical analysis

Data are expressed as mean±S.D. and analyzed for statistical significance by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc for multiple comparisons (Tukey test) using an InStat software package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences between mean values were

considered significant when $P < 0.05$. The values were compared using one-way analysis and Tukey test for simultaneous comparisons between groups.

3. Results

3.1. Physico-chemical characterization of nanocapsule formulations

After preparation, the particle sizes were 202 nm (Abisab- NC), 214 nm (Abisab/IndOH- NC), 207 nm (Abisab/IndOEt- NC), 195 nm (Abisab/IndOH/IndOEt- NC) and 192 nm (drug-unloaded nanocapsules). All suspensions showed monomodal size distributions and polydispersity indexes lower than 0.19, indicating narrow size distributions. The pH values were 5.93 (Abisab- NC), 5.52 (Abisab/IndOH- NC), 5.80 (Abisab/IndOEt- NC), 5.42 (Abisab/IndOH/IndOEt- NC) and 5.65 (drug-unloaded nanocapsules). The zeta potential values were -14.2, -13.4, -13.6, -14.1 and -15.3 mV, respectively (Table 1). Drug contents were close to 0.54, 0.46 and 18.0 mg/mL of indomethacin, indomethacin ethyl ester and α -bisabolol, respectively, and the encapsulation efficiencies were close to 100% for all formulations.

Table 1: Diameter, PDI, zeta potential and pH of nanocapsules

	<i>Diameter (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Zeta potential (mV)</i>	<i>pH</i>	<i>Drug content (mg/mL)</i>	<i>Encapsulation efficiency (%)</i>
Abisab- NC	202±1	0.10±0.01	-14.2±0.3	5.93±2	18.80	-----
Abisab/IndOH- NC	214±1	0.07±0.05	-13.4±0.7	5.52±7	18.45/0.56	-----
Abisab/IndOEt- NC	207±2	0.18±0.03	-13.6±0.6	5.80±1	17.39/0.42	-----
Abisab/IndOH/IndOEt- NC	195±3	0.06±0.05	-14.1±0.8	5.42±5	18.20/0.54/0.45	96.44/97.98/99.36
NCB	192±2	0.05±0.05	-15.3±0.2	5.65±2	-----	

NTA analysis of α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules showed an average diameter of 192 nm. A particle size/concentration graphic are showed in Figure 1 and corroborated the submicrometric characteristic of the nanocapsules. Figure 2 presents a photograph of the sample video frame created by the Nanosight[®] NTA software in which the particles selected for the measuring can be seen. The particle size/relative intensity graph are showed in Figure 3 and proved that the formulation is a nanotechnological system. Photographs by transmission electron microscopy showed the formation of vesicular particles containing indomethacin, indomethacin ethyl ester and α -bisabolol. (Figure 4). During the analysis of multiple light backscattering of Abisab/IndOH/IndOEt- NC, the intensity of transmitted light remained was close to zero over the glass cell, which is suitable for analyzing the signal of transmitted light (Figure 5A). It was observed (Figure 5B) in the left of the graph, which corresponds to the bottom of the glass cell, a small variation in the amount of backscattered light during the analysis time compared to the initial time (Figure 5B).

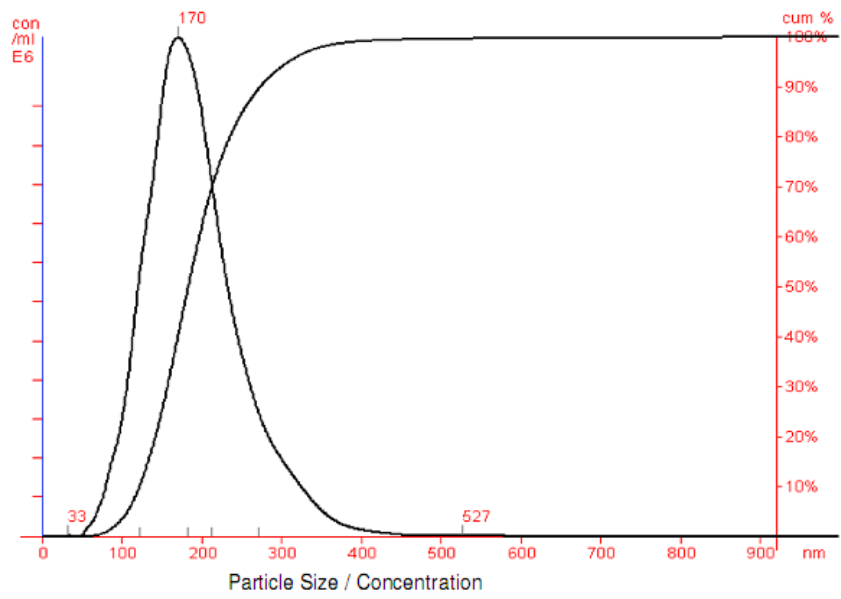


Figure 1. Particle size/ concentration graphic by NTA analysis

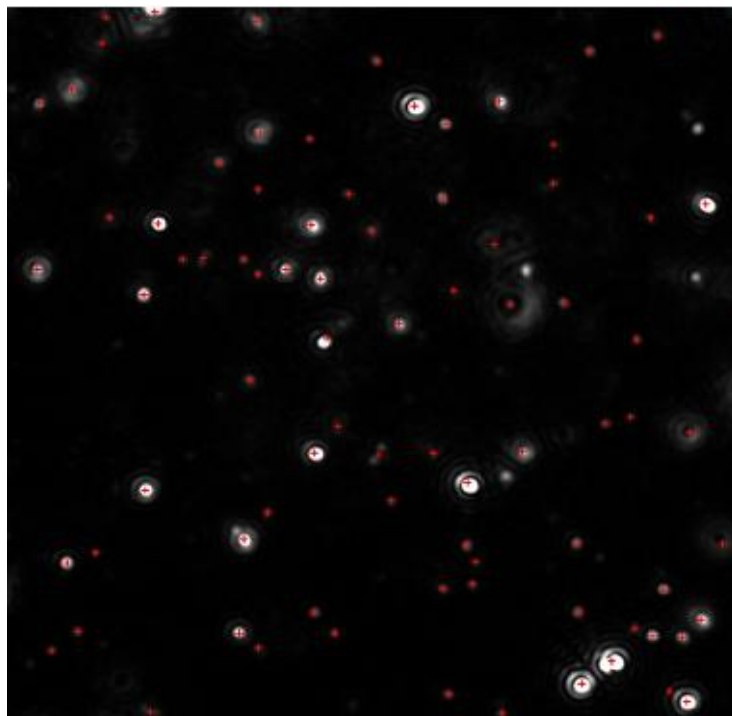


Figure 2. Photo of the sample video frame created by NTA analysis

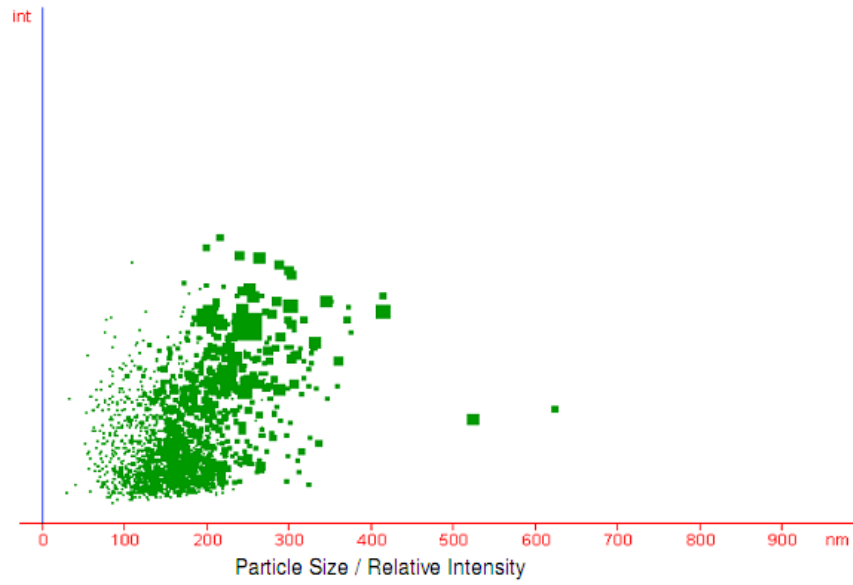


Figure 3. Particle size/relative intensity graph by NTA analysis

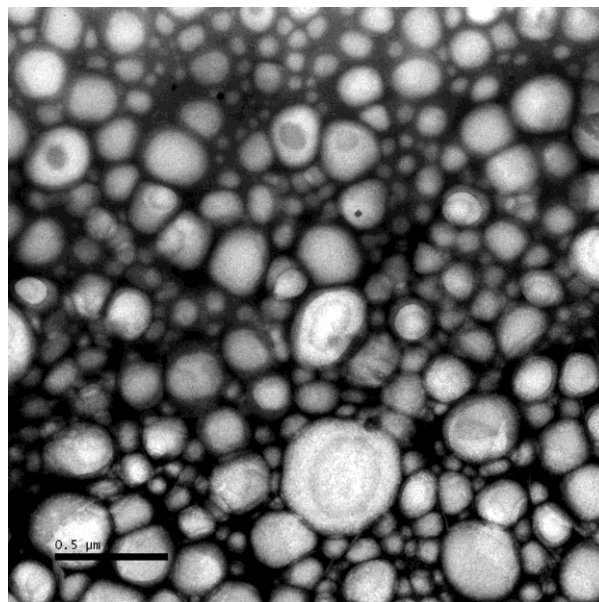


Figure 4. Microphotograph by transmission electron microscopy



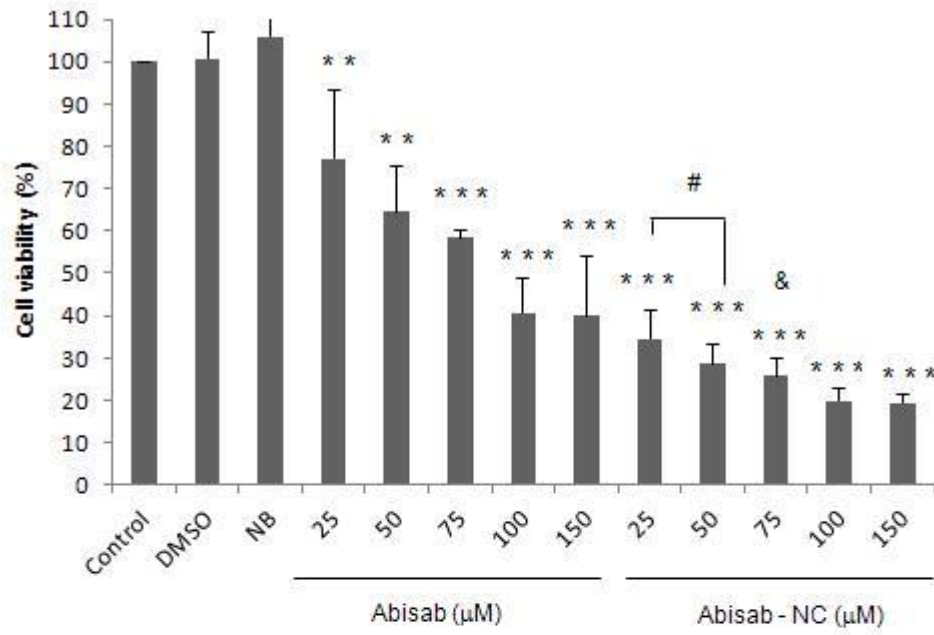
Figure 5. Analysis of transmission and of Delta Backscattering by Turbiscan LAb®. Intensity of transmitted light (A) and intensity of backscattered light (B) of Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulation.

3.2. *Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations decrease cell viability in rat glioma cells*

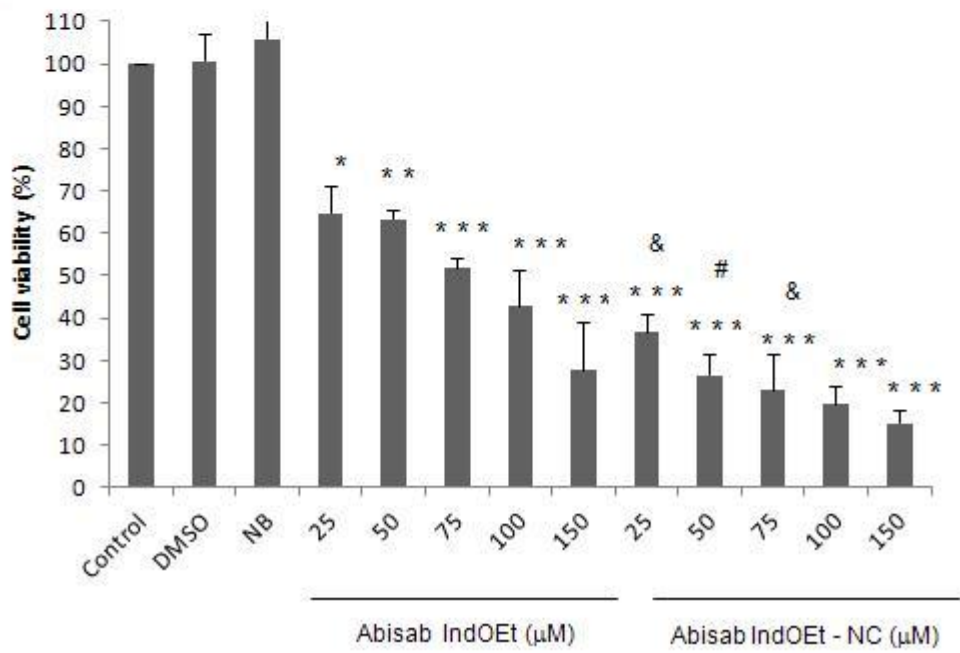
To investigate whether the formulations (Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC) affect the cell viability, we used an MTT assay that measures the mitochondrial activity and, indirectly, the cell viability of cells treated with these formulations. Cultured cells were treated with several concentrations (25, 50, 75, 100 or 150 μM) of α -bisabolol, α -bisabolol/indomethacin, α -bisabolol/indomethacin ethyl ester or α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester in solution or in nanocapsule formulations for 24 h. Analysis of MTT assay showed that all concentrations of nanocapsule formulations and solution of substances caused a significant reduction in cell viability compared to the control culture cells and nanocapsule drug-unloaded. (Fig. 6). The IC_{50} values showed that α -bisabolol-loaded nanocapsules increases 19 fold the cytotoxicity when compared to α -bisabolol in solution for same cell line (Table 2). A significant reduction on cell viability

was also observed after the treatment with Abisab/IndOH- NC which increases 13 fold the cytotoxicity when compared to α -bisabolol/indomethacin in solution, after the treatment with Abisab/IndOEt- NC which increases 8 fold the cytotoxicity compared to the respective solution and after the treatment with the nanocapsule formulation containing the three drugs, which also increases 8 fold the cytotoxicity. (Fig. 6A, 6B, 6C and 6D).

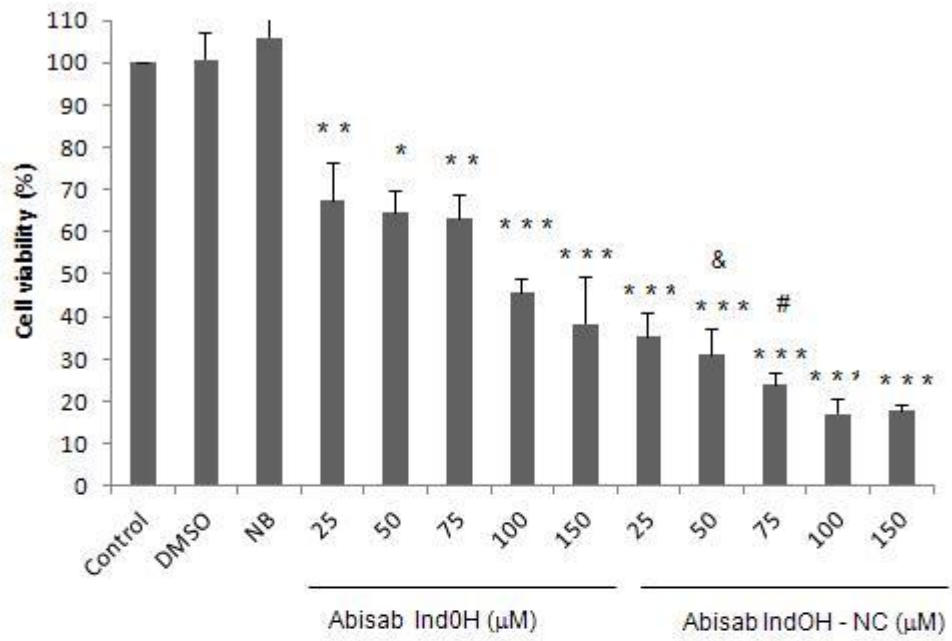
A



C



B



D

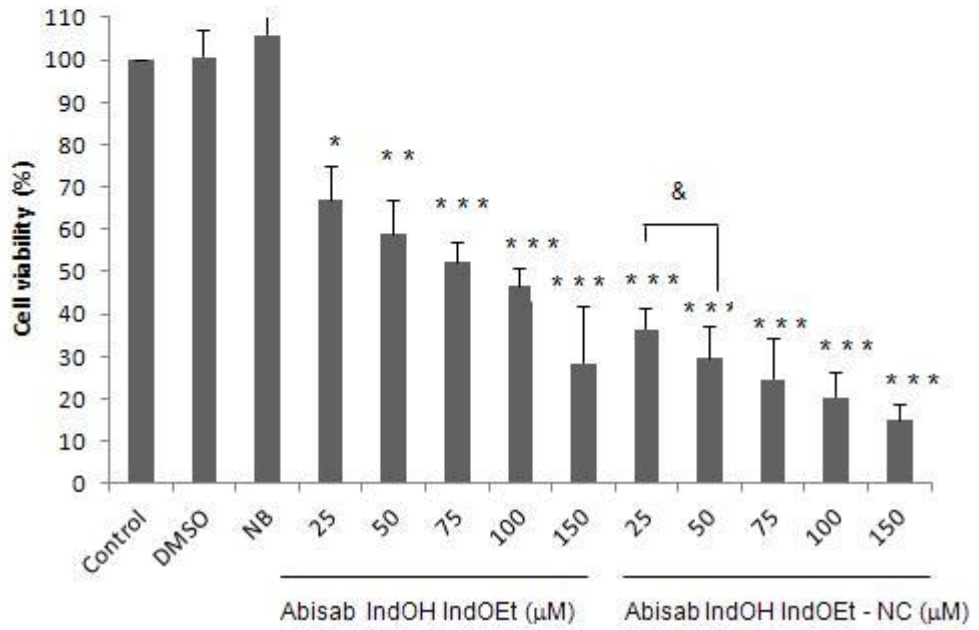


Figure 6. Effect of α -bisabolol, α -bisabolol/indomethacin, α -bisabolol/indomethacin ethyl ester and α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester in solution or in nanocapsule formulations on cell viability of glioma cell lines. C6 glioma cell line were grown on a 96-well plate and, after reaching approx. 80% confluence, the cultures were treated with 25, 50, 75, 100, or 150 μ M of (A) α -bisabolol (Abisab) or α -bisabolol-loaded nanocapsules (Abisab-NC); (B) α -bisabolol/indomethacin (Abisab IndOH) or α -bisabolol/indomethacin-loaded nanocapsules (Abisab IndOH-NC); (C) α -bisabolol/indomethacin ethyl ester (Abisab IndOEt) or α -bisabolol/indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules (Abisab IndOEt-NC) and (D) α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester (Abisab IndOH IndOEt) or α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules (Abisab IndOH IndOEt-NC) for 24 h. After 24 h of treatment, the cell viability was evaluated by MTT assay, as described in materials and methods. The cell viability was represented in relation of control cells (100% of cell viability). The values are represented as means \pm S.D. of three independent experiments made in duplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey test). *Significantly different from the control group (P<0.05); **Significantly different from the control group (P<0.01); ***Significantly different from the control group (P<0.001). [&]Significantly different from the respective group treated with drug in solution (P<0.05). [#]Significantly different from the respective group treated with drug in solution (P<0.01).

Table 2: IC₅₀ values of drugs in solution or in nanocapsules formulations in C6 glioma cell lines

	Drugs in solution	Drugs in nanocapsules
*Indomethacin	97.08	38.44
*Indomethacin ethyl ester	22.60	89.99
α -bisabolol	88.46	4.57
α -bisabolol and Indomethacin	95.60	7.21
α -bisabolol and indomethacin ethyl ester	67.66	7.55
α -bisabolol, indomethacin and indomethacin ethyl ester	69.31	8.65

Mean (S.D.) IC₅₀ values (μ M) for 24 h of treatment with α -bisabolol, α -bisabolol/indomethacin, α -bisabolol/ indomethacin ethyl ester, α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester, Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC by MTT assay, as described in Materials and Methods. * Results from Bernardi et al., 2008.

3.3. *Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations inhibit growth of the glioma cell lines*

In order to investigate the effect of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC on cell growth, we studied the effect of these formulations in the proliferation of rat and human glioma cell lines (C6 and U138-MG respectively). Treatment of glioma cells with Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC (50 μ M) for 24 h resulted in significant decrease in cell number when compared to the control cultures in both cell lines (Fig. 7A and 7B). The treatment of drug-

unloaded nanocapsules did not show significant alterations in cell proliferation (Fig. 7). These effects were observed in human and rat glioma cell lines.

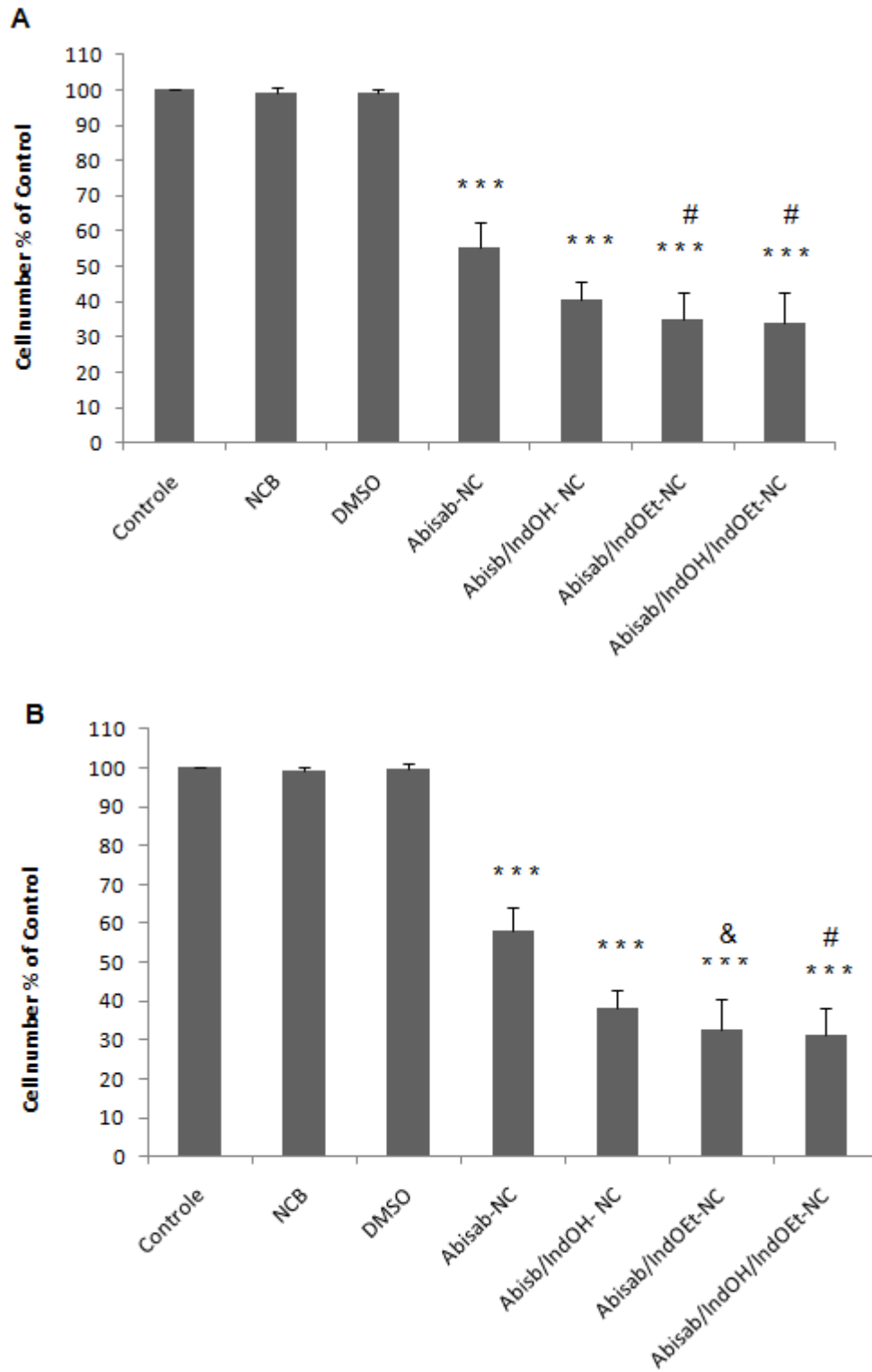


Figure 7. Effect of nanocapsules containing α -bisabolol, α -bisabolol/indomethacin, α -bisabolol/indomethacin ethyl ester and α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester on glioma cell proliferation. Semi-confluent cultures of C6 (A) and U138-MG (B) glioma cell lines were treated with 50 μ M of α -bisabolol-loaded nanocapsules (Abisab-NC); α -bisabolol/indomethacin-loaded nanocapsules (Abisab IndOH-NC); α -bisabolol/indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules (Abisab IndOEt-NC) and α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules (Abisab IndOH IndOEt-NC) for 24 h. Cultures were also treated with drug-unloaded nanocapsules (NCB). After 24 h of treatment, the cells were detached with 0.25% trypsin-EDTA and counted in hemocytometer. The values are represented as means \pm S.D. of three independent experiments made in duplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey test). ***Significantly different from the control group (P<0.001); #Significantly different from the Abis- NC formulation (P<0.01); &Significantly different from the Abis- NC formulation (P<0.05).

3.4. Cell death induced by Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations in glioma cell lines

To verify whether Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC could induce necrosis cell death, glioma cells were treated with 50 μ M of these nanocapsule formulations for 24 h and then analyzed for cell death. Fig. 8 shows representative pictures of C6 glioma cells treated with 50 μ M of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations. As observed, the glioma cells treated with 50 μ M of nanocapsules formulations presented a reduction in the cell number with no significant PI incorporation (Fig. 8D, E, F and G). The treatment of drug-unloaded nanocapsules did not show significant alterations in PI incorporation (Fig. 8C).

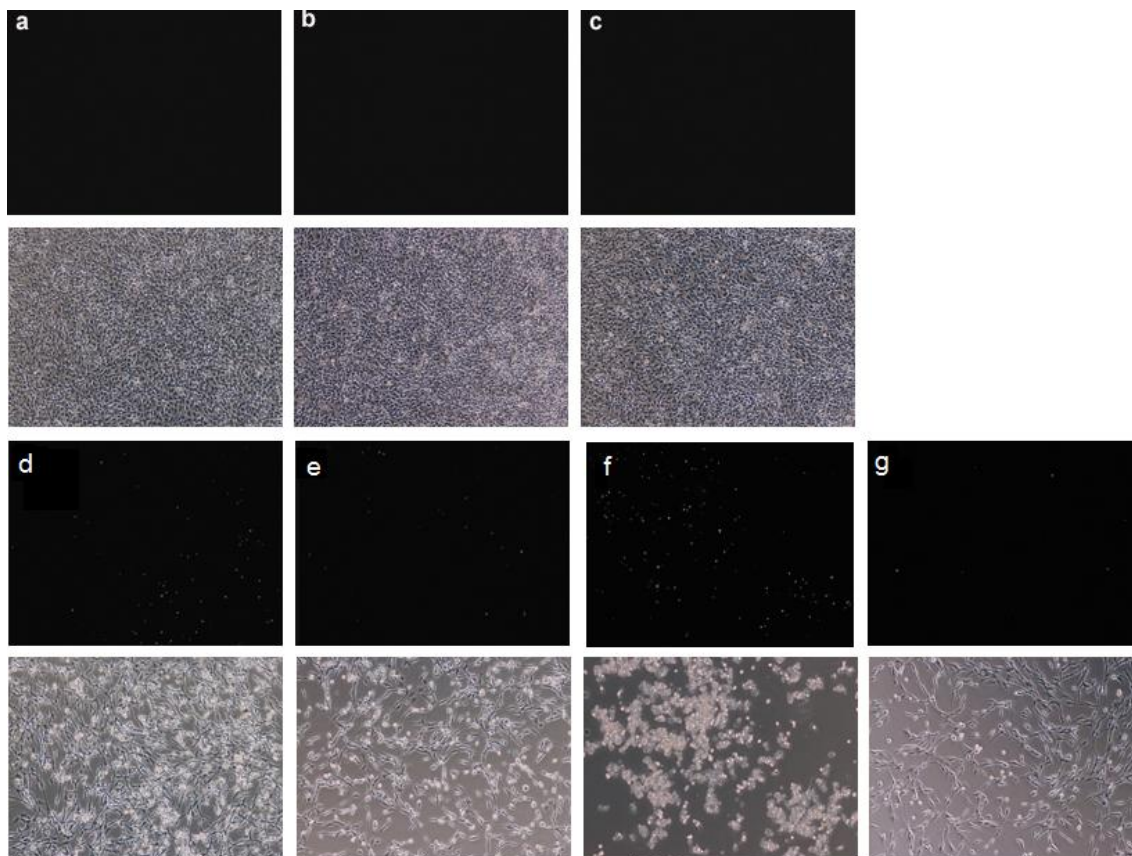
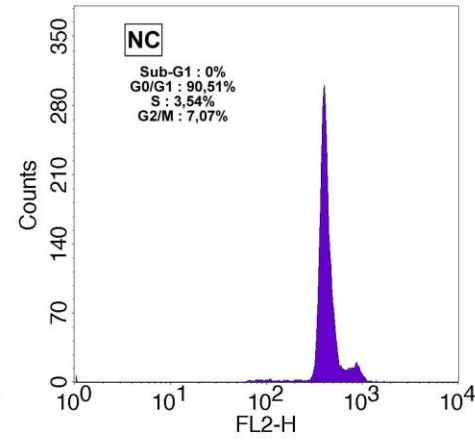
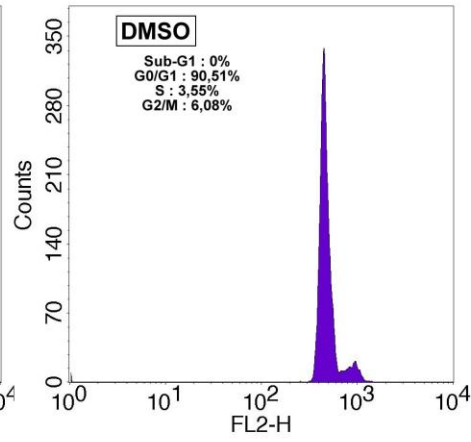
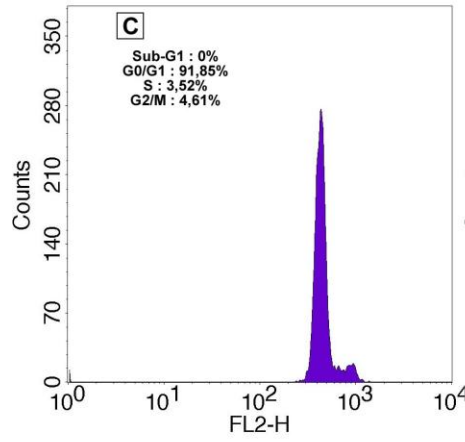


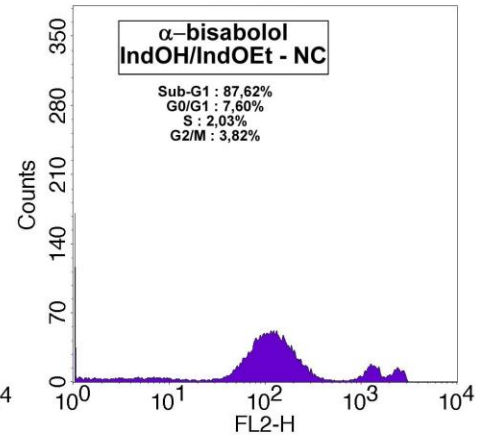
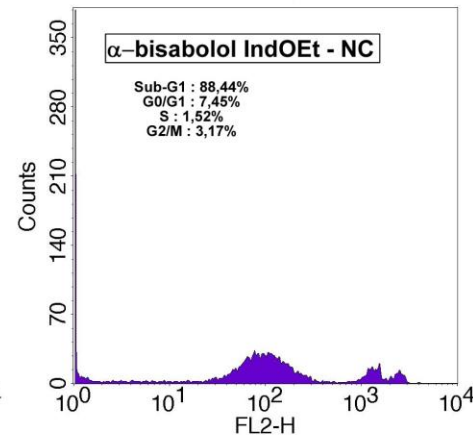
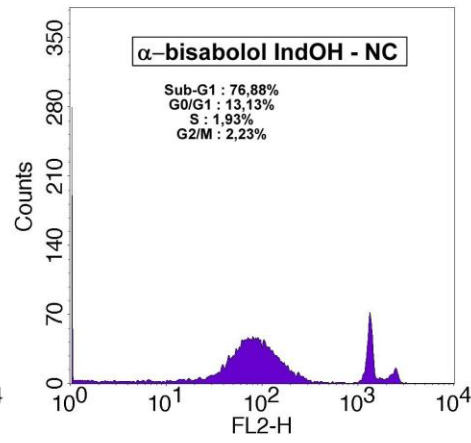
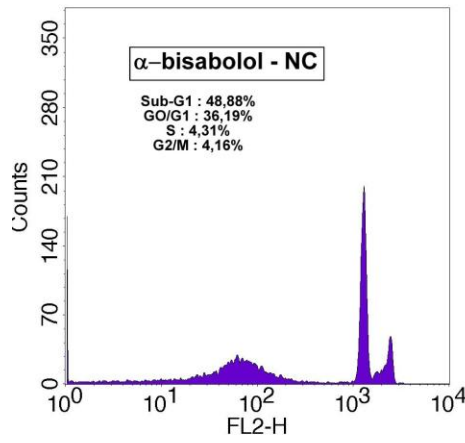
Figure 8. Effect of nanocapsules containing α -bisabolol, α -bisabolol/indomethacin, α -bisabolol/indomethacin ethyl ester and α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester on cell death in C6 glioma cells by propidium iodide incorporation. Representative pictures of: control cultures (a); cells treated with 10% DMSO solution (b) cells treated with drug-unloaded nanocapsules (NC) (c); cells treated with 50 μ M of α -bisabolol-loaded nanocapsules (d); cells treated with 50 μ M of α -bisabolol/indomethacin-loaded nanocapsules (e); cells treated with 50 μ M of α -bisabolol/indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules (f); cells treated with 50 μ M of α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules (g). After 24 h of treatment, glioma cells were incubated with 5 μ M of propidium iodide (PI). Cellular death was analyzed by PI incorporation that was visualized using a Nikon inverted microscope. Panels below a, b, c, d, e, f, g are correspondent contrast phase photomicrographs.

3.5. Effect of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations on cell cycle phases

In order to confirm the antiproliferative effect of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations, cell cycle analysis was performed after 24h of treatment. Analysis of cell cycle distribution evidenced that the treatment of drug-unloaded nanocapsules did not show significant alterations in the cell cycle phases when compared to control cells. On the other hand, the treatment with 50 or 250 μM of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations caused a strong decrease in G0/G1 phase cell population, followed by the significant formation of sub-G1 apoptotic cells, suggesting that alterations in cell cycle phases preceded apoptosis (Fig. 9).



A



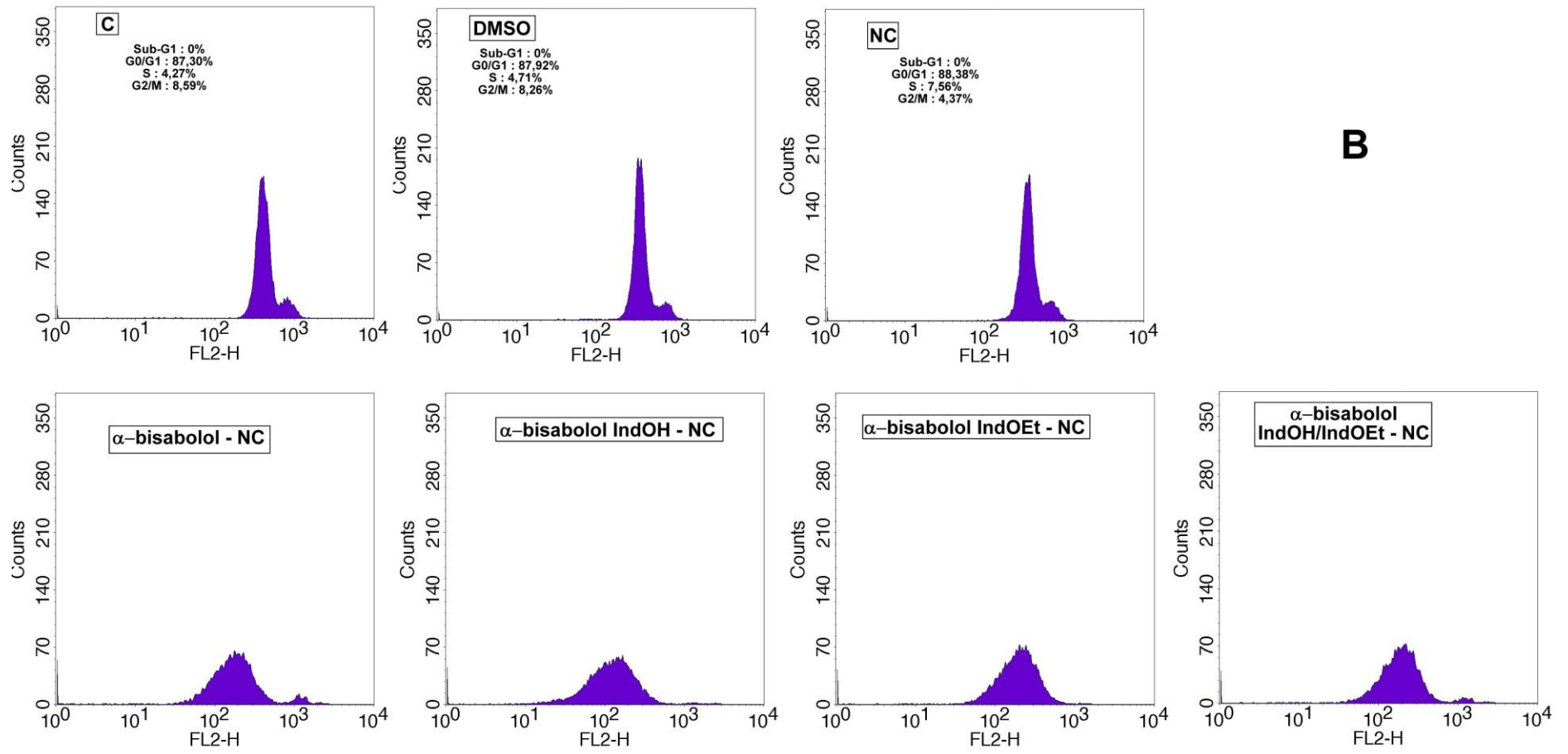
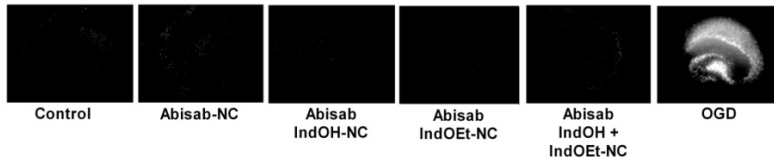


Figure 9. Effect of α -bisabolol, α -bisabolol/indomethacin, α -bisabolol/indomethacin ethyl ester and α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester nanocapsule formulations on the cell cycle of the C6 cell line. (A) Cells treated with 50 μ M of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations. (B) Cells treated with 250 μ M of the same nanocapsules formulations. The correspondent percentages of phases sub-G0/G1, G0/G1, S and G2/M are presented in each graphic. Control cultures were treated with DMSO or drug-unloaded- nanocapsules (NC).

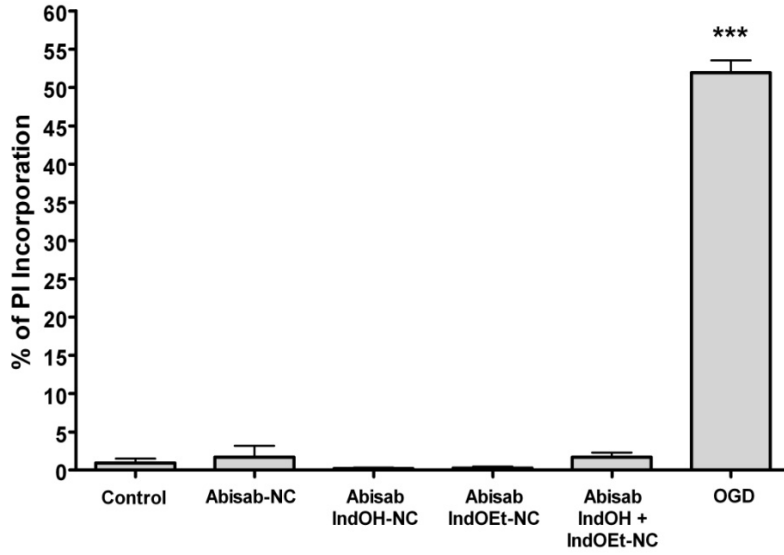
3.6. Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations did not cause cytotoxic effect on organotypic hippocampal slice cultures

To evaluate the effect of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations on normal neural cells, organotypic hippocampal slice cultures were used as model. These cultures provide an excellent *in vitro* model system to study physiological factors, cellular and molecular mechanisms of neural death, and pharmacological compounds to neural survival (Holopainen, 2005). After 14 days in culture, the organotypic cultures were treated with 50 or 250 μ M of nanocapsule formulations for 24 h and the cell death was analyzed by PI uptake (Fig. 10). As a positive control of cell damage we used organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD), which showed significant cell damage (approximately 50%). It is important to note that all Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations did not promote significant organotypic hippocampal culture damage.

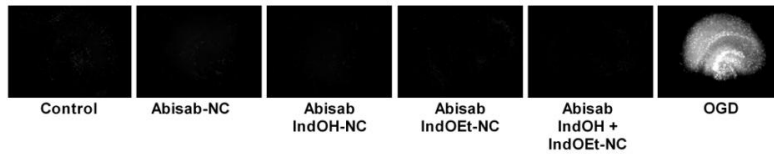
A



B



C



D

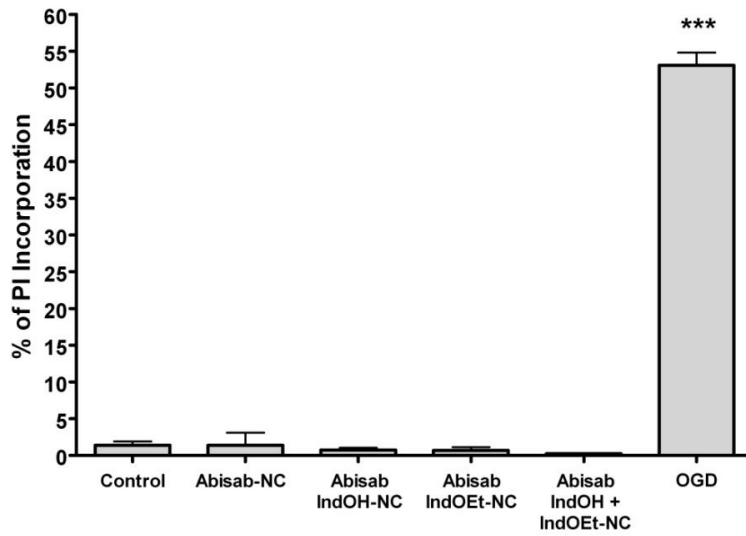


Figure 10. Effect of α -bisabolol-loaded nanocapsules, α -bisabolol/indomethacin-loaded nanocapsules, α -bisabolol/indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules and α -bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules on organotypic hippocampal slice cultures. (A) and (C) representative pictures of organotypic hippocampal cultures. (B) and (D) quantitative analysis of hippocampus damage after treatment of formulations. Organotypic hippocampal slices at 14 days were treated with drug-unloaded nanocapsules (NC), 50 or 250 μ M of nanocapsules formulations for 24 h. (A) and (B): treatment with 50 μ M of formulations, (C) and (D): treatment with 250 μ M of formulations; Control: organotypic cultures not exposed to formulations; OGD: neural cultures had been exposed to oxygen glucose deprivation and then used as a positive control of cell damage. Cellular death was analyzed by propidium iodide (PI) incorporation, which was visualized using a Nikon inverted microscope (at 40 \times magnification). Data represent the means \pm S.D. of nine independent experiments made in duplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey test). ***Significantly different from the control group ($P < 0.001$).

4. Discussion

The blood-brain barrier, when is formed by the tight endothelial cell junctions of capillaries within the brain represents an obstacle to ability of many drugs to penetrate brain tissue and to enter the central nervous system. Malignant brain tumor, as gliomas, respond poorly to chemotherapy, representing a particular challenge, presumably because the majority of antitumor drugs cannot be delivered in effective concentrations to the tumor site (Gulyaev et al., 1999, Aktas et al., 2005). One of the possibilities to cross this barrier is the application of nanoparticles in order to target the drug to the brain (Calvo et al., 2001; Brigger et al., 2002b). Polymer nanoparticles have attracted considerable attention as potential drug delivery systems. Enhancement of therapeutic efficacy and reduction of toxicity have been demonstrated for a variety of drugs associated with nanoparticles (Couvreux et al., 1995). Several authors showed promising results using nanoparticles: efficient drug protection (Chavany et al., 1994; Ourique et al., 2008), controlled release (Bennis et

al., 1994), drug release and drug transport (Beck et al., 2007) and cell internalization (Couvreur et al., 1977).

Nanoparticulated systems has been extensively studied by our research group, including the mechanism of encapsulation and drug release (Guterres et al., 2000; Schaffazick et al., 2003; Pohlmann et al., 2004; Beck et al., 2007; Schaffazick et al., 2007; Poletto et al., 2007). In this study we prepared nanocapsule in which the oily cavity, that is structurally necessary to form the nanocarrier, is formed by an active drug (α -bisabolol) which add therapeutic effect to the formulation (Cavalieri et a., 2004). The suspensions presented a bluish reflection resulting from the brownian motion of nanoparticles in suspension, features already reported by our research group (Guterres et al., 2000; Schaffazick et al., 2003). The average diameter was submicrometric (closed to 200 nm) and it is in agreement with literature data for nanocapsules formed by the interfacial deposition method (Michalowski et al., 2004). The zeta potential values were close to 14 mV for all formulations due to the characteristics of the polysorbate 80 which covers the nanocapsules. NTA analysis for the Abisab/IndOH/IndOEt- NC showed an average diameter of 192 nm, quite similar to one found by PCS analysis which suggested that the both method could be interchangeable for these nanocapsules.

Analysis of backscattering of Abisab/IndOH/IndOEt- NC showed in the left of the graph, which corresponds to the bottom of the glass cell, a small variation in the amount of backscattered light during the analysis time compared to the initial time. This variation was less than 2 % over the initial time, showing no significant tendency to sedimentation of particles under the studied conditions. There were no variations in the right side of the graph, which corresponds to the sample surface indicating that the samples do not tend to instability phenomena such as migration of particles to the surface. The analysis of the central part of the graph showed no increase of particle size because the observed no variation. Slight variations are reversible phenomena and they were expected because the formulations are suspensions. This analysis showed that the suspension was stable under the studied conditions.

In the present study we also investigated the cytotoxic effects of α -bisabolol-loaded nanocapsules, α -bisabolol/indomethacin-loaded nanocapsules, α -bisabolol/indomethacin ethyl ester- loaded nanocapsules and α -

bisabolol/indomethacin/indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules on glioma cell lines. Previous works from our group showed that indomethacin caused antiproliferative effects on glioma cell lines due to an inhibition of cell cycle progression and by increasing the catabolism of extracellular purines (Bernardi et al., 2006; Bernardi et al., 2007) and proved that this NSAID in nanocapsule formulations are more cytotoxic for glioma cells than the drug in solution. In the present work we showed that formulations of nanocapsules were capable to cause a large cytotoxic effect upon glioma cells and were more cytotoxic than respective substances in solution in the lower tested concentrations (25, 50 and 75 μ M). The cell proliferation evaluation showed that nanocapsule formulations reduced cell count when compared to those which received no treatment or those which receive treatment with drug-unloaded nanocapsules. The cell proliferation assay also demonstrated that Abisab/IndOEt-NC and Abisab/IndOH/IndOEt- NC significantly reduced the cell count in comparison with nanocapsule containing α -bisabolol only.

Recently, Parashar et al. (2005) showed an arrest in the G2/M phase of human neuroblastoma cells using CAY10404, a highly selective COX-2 inhibitor. In previous studies, we showed a significant increase in the proportion of cells in the G0/G1 and G2/M phases and the concurrent decrease in the proportion of cells in the S phase after 48 h treatment with 100 μ M indomethacin, suggesting the arrest of the cells in G1 and/or G2 phase of the cell cycle. These results indicate that the antiproliferative effects of indomethacin in gliomas cell lines are, at least in part, due to inhibition of cell cycle progression (Bernardi, 2006). Several lines of evidence link NSAIDs effects to the cell cycle. In gliomas, celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, exerts antiproliferative effects via the transcriptional inhibition of two essential components of the cell cycle machinery, cyclin A and cyclin B (Kardosh et al., 2004). In human colon cancer cells, indomethacin was shown to induce cell cycle arrest in G2 phase in a p53-dependent way, through induction of p21WAF1/CIP1 and consequent inhibition of CDK2 and CDK4 (Xu and Zhang, 2005). Since the glioma cell lines used in this study are p53 positive, p53-dependent mechanism could be involved in the arrest of cell cycle induced by NSAIDs. Cavalieri et al. (2004) performed flow cytometric analysis in order to evaluate the effect of α -bisabolol on

the cell cycle. That study observed the appearance of apoptotic nuclei in T67 and U87 cells, obtaining a percentage of 30% of sub-G0/G1 peaks in U87 cells after 24h of treatment with 6 μ M of α -bisabolol. The present study evaluates the effect of nanocapsule formulations containing indomethacin, ethyl ester of indomethacin and α -bisabolol in the cell cycle of the C6 cell line. The results of cell cycle distribution evidenced that the treatment of drug-unloaded nanocapsules and DMSO did not show significant alterations in the cell cycle phases when compared to control cells. On the other hand, the treatment with 50 or 250 μ M of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations caused a strong decrease in G0/G1 phase cell population, followed by a significant formation of sub-G1 apoptotic cells (Fig. 9). Cells treated with 50 μ M of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC formulations showed the formation of sub-G1 peak with a percentage between 48.88- 88.44%. Cells treated with a higher concentration, 250 μ M of the same nanocapsules formulations showed a higher peak, therefore the values were unquantifiable. These results suggest that treatment with nanocapsule formulations causes alterations in cell cycle phases that preceded apoptosis.

It is widely accepted that apoptosis is preferred to necrosis as a mechanism of tumour cell killing, since it do not enhance inflammatory processes. Necrosis is a pathological process which occurs when cells are exposed to a serious physical or chemical insult. It is described in the literature that can be considered good candidates for antitumoral drugs those that promote cell death by a mechanism other than the necrosis. In the present study, we observed that 50 μ M of nanocapsule formulations (Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC) is sufficient to promote antiproliferative effects in glioma cell lines withstand necrosis.

One of the major recurring problems found in drugs for cancer chemotherapy is its non-specificity to tumor cells in such a way to limit the dose regimen of treatment (Kim and Lee, 2001). Thus, to assess the selective cytotoxic effect of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC upon glioma cell cultures, hippocampal organotypic cultures were used as a model of normal neural cells. Therefore, an important outcome of the present study is that,

25 μM of Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC was sufficient to cause significant cell viability inhibition (Fig. 6) without necrosis in glioma cell lines (Fig. 8), a ten fold concentration of these formulations (250 μM) did not cause cell death in the organotypic cultures. These results indicate a selective cytotoxicity of these formulations upon tumour cells, which could be explained, at least in part, by glioma cells accelerated metabolism, by they higher cell division rate and by an increased endocytotic activity, enhancing the uptake of nanocapsules.

It should be stressed that one of the most effective clinically used anti-glioma drugs, carmustine, is, at a concentration corresponding to LD_{10} (13 mg/kg), not able to cause a 100% cell death of glioma cells in vitro (Rosenblum et al., 1983; Young, 1989). Taking in account the lack of substantial survival improvement using present antitumoral agents, efforts in order to develop and apprimorate innovative approaches are justified. Our results imply that nanocapsule formulations may be considered potential candidates for glioma treatment, since they could target these substances to the CNS and showed higher cytotoxicity than drugs in solution in lower tested concentrations.

Since in vitro studies are limited, emphasizes the importance of investigation using in vivo model of glioma which could be useful to determine if the use of nanocapsules increase the concentration of these substances in the tumor, to confirm the distinct effects of nanocapsules observed between normal versus tumor cells, as well as to define appropriate therapeutic doses for gliomas

Acknowledgments

This study was supported by the Brazilian agencies: CNPq, Rede Brasil-França CNPq/MCT, Rede Nanocosméticos/CNPq- MCT and FINEP/MCT. T. Terroso was a recipient of Brazilian CNPq fellowship. A. Bernardi was the recipient of a CAPES Post-doctoral fellowship.

References

Aktas, Y., Andrieux, K., Alonso, M.J., Calvo, P., Gürsoy, R.N., Couvreur, P., Capan, Y., 2005. Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. *Int. J. Pharm.* 298, 378–383.

Baylei C.C., Spooner D. Brain tumors in children. In: Peckham M., Pinedo H.M., Veronesi U. (eds). *Oxford Textbook of Oncology*. New York: Oxford University Press, p.2055-2063, 1995.

Beck, R.C.R., Pohlmann, A.R., Hoffmeister, C., Gallas, M.R., Collnot, E., Schaefer, U.F., Guterres, S.S., Lehr, C.M., 2007. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between in vitro drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 18–30.

Bennis, S., Chapey, C., Couvreur, P., Robert, J., 1994. Enhanced cytotoxicity of doxorubicin encapsulated in polyisohexylcyanoacrylate nanospheres against multidrug-resistant tumour cells in culture. *Eur. J. Cancer* 1, 89–93.

Bernardi A, Jacques-Silva MC, Delgado-Cañedo A, Lenz G, Battastini AMO (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma cell line. *Eur. J. Pharm.* 532: 214-222.

Bernardi A, Bavaresco L, Wink MR, Jacques-Silva MC, Delgado-Cañedo A, Lenz G, Battastini AMO (2007). Indomethacin stimulates activity and expression of ecto- 5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell lines. *Eur. J. Pharm.* 569:8-15.

Bernardi, A., Frozza, L.R., Jager, E., Figueiró, F., Bavaresco, L., Salbego, C., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Battastini, A. (2008). Selective cytotoxicity of indomethacin ethyl Ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. *European Journal of Pharmacology*.

Bernardi A, Braganhol E, Jäger E, Figueiró F, Edelweiss MI, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AMO. (2009a). Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Letters*, 281(1): 53-63.

Bondy M.L., Scheurer M.E., Malmer B., Barnholtz-Sloan J.S., Davis F.G., Il'yasova D., Kruchko C., McCarthy B.J., Rajaraman P., Schwartzbaum J.A., Sadetzki S., Schlehofer B., Tihan T., Wiemels J.L., Wrensch M., Buffler P.A., 2008. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 113:1953-1968.

Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P., 2002a. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 631–651.

Brigger, I., Morizet, J., Aubert, G., Chacun, H., Terrier-Lacombe, M.J., Couvreur, P., Vassal, G., 2002b. Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumour targeting. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 928–936.

Brigger, I., Morizet, J., Laudani, L., Aubert, G., Appel, M., Velasco, V., Terrier-Lacombe, M., Desmaële, D., D'Angelo, J., Couvreur, P., Vassal, G., 2004. Negative preclinical results with stealth® nanospheres-encapsulated doxorubicin in an orthopic murine brain tumormodel. *J. Control. Release* 100, 29–40.

Calvo, P., Gouritin, B., Chacum, H., Desmaele, D., D'Angelo, J., Noel, J.P., Georjin, D., Fattal, E., Andreux, J.P., Couvreur, P., 2001. Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharm. Res.* 18, 1157–1166.

Cavaliere, E., Mariotto, S., Febrizi, C., Prati, A., Gottardo, R., Leone, S., Berra, L., Lauro, G., Ciampa, A., Suzuki, H., 2004. Alfa-bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

Chavany, C., Saison-Behmoaras, T., Le Doan, T., Puisieux, F., Couvreur, P., Helene, C., 1994. Adsorption of oligonucleotides onto polysohexylcyanoacrylate nanoparticles protects them against nucleases and increases their cellular uptake. *Pharm. Res.* 11, 1370–1378.

Couvreur, P., Tulkens, P., Roland, M., Trouet, A., Speiser, P., 1977. Nanocapsules: a new type of lysosomotropic carrier. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 84, 323–326.

Couvreur P, Vauthier C., 2006. Nanotechnology; intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 23:1417-1450.

Cruz, L., Soares, U. L., Dalla Costa, T., Mezzalana, G., Silveira, N.P., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2006. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Pharmaceutical Nanotechnology*.

Frezza, R.L., Horn, A.P., Hoppe, J.B., Simão, F., Gerhardt, D., Comiran, R., Salbego, C., 2009. A comparative study of beta-amyloid peptides Aβ1-42 and Aβ25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem. Res.* 34, 295 - 303.

Guterres, S.S., Weiss, V., de Luca Freitas, L., Pohlmann, A.R., 2000. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spraydried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. *Drug Deliv.* 7, 195–199.

Harris R.E., 2009. Cyclooxygenase-2 (COX-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacol.* 17:55 –67.

Hyde CAA, Missailidis S., 2009. Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 9: 701–715.

Yung, W.K., 1989. In vitro chemosensitivity testing and its clinical application in human gliomas, *Neurosurg. Rev.* 12, 197– 203.

Holopainen, I.E., 2005. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochem. Res.* 30, 1521–1528.

ICH (2005) Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1).

Jäger, A., Stefani, V., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2007. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *Int. J. Pharm.* 338, 297 –305.

Jakovlev, V, Schlichtegroll, A. Von, 1969. On the inflammation inhibitory effect of alpha-bisabolol, an essential component of chamomilla oil, *Arzneimittelforschung* 19, 615–616.

Jakovlev, V., Isaac., O, Thiemer, K., Kunde, R., 1979. Pharmacological investigations with compounds of chamomile ii. New investigations on the antiphlogistic effects of alpha-bisabolol and bisabolol oxides, *Planta Med.* 35, 125–140.

Kalgutkar, A.S., Marnett, A.B., Crews, B.C., Remmel, R.P., 2000. Ester and amide derivatives of the nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin, as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *J. Med. Chem.* 43, 2860–2870.

Kardosh, A., Blumenthal, M., Wang, W.J., Chen, T.C., Schonthal, A.H., 2004. Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. *Can. Biol. Ther.* 3, 55–62.

Kim, S.Y., Lee, Y.M., 2001. Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(ϵ -caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials* 22, 1697–1704.

Koziara, J.M., Lockman, P.R., Allen, D.D., Mumper, R.J., 2003. In situ bloodbrain barrier transport of nanoparticles. *Pharm. Res.* 20, 1772–1778.

Lockman, P.R., Koziara, J., Roder, K.E., Paulson, J., Abbruscato, T.J., Mumper, R.J., Allen, D.D., 2003. In vivo and in vitro assessment of baseline bloodbrain barrier parameters in the presence of novel nanoparticles. *Pharm. Res.* 20, 705–713.

Macklis, J.D., Madison, R.D., 1990. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J. Neurosci. Methods* 31, 43–46.

Michalowski, C. B., S. S. Guterres & T. Dalla Costa., 2004. *J Pharm Biomed Anal* 35: 1093-1100.

Noraberg, J., Kristensen, B.W., Zimmer, J., 1999. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res. Protoc.* 3, 278–290.

Ourique A. F., Pohlmann A. R., Guterres S. S., Beck R. C. R., 2008. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int. J.Pharm.* 352, 1-4

Parashar, B., Shankar, L.S., O'Guin, K., Butler, J., Vikram, B., Shafit-Zagardo, B., 2005. Inhibition of human neuroblastoma cell growth by CAY10404, a highly selective COX-2 inhibitor. *J. Neuro-Oncol.* 71, 141–148.

Poletto, F.S., Jäger, E., Ré, M.I., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2007. Ratemodulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. *Int. J. Pharm* 345, 70–80.

Raffin, R.P., Colomé, L.M., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2006. Preparation, characterization, and in vivo anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63, 198–204.

Rosenblum, M.L., Gerosa, M.A., Dougherty, D.V., Wilson, C.B., 1983. Improved treatment of a brain-tumor model, *J. Neurosurg.* 58, 177–182.

Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., Dalla-Costa, T., Guterres, S.S., 2003. Freezedrying colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 501–505.

Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2007. Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability evaluation. *Pharmazie* 62, 354–360.

Stoppini, L., Buchs, P.A., Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37, 173–182.

Toomey DP, Murphy JF, Conlon K. C., 2009. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. *Surgeon.* 7:174-80.

Xu, M., Zhang, G.Y., 2005. Effect of indomethacin on cell cycle proteins in colon cancer cell lines. *World J. Gastroenterol.* 11(11), 1692–1696.

PARTE III

DISCUSSÃO

Os gliomas destacam-se entre os tumores como sendo os mais refratários frente aos tratamentos, mesmo com o contínuo avanço da radioterapia, quimioterapia e técnicas cirúrgicas (Ohgaki & Kleihues, 2009), apresentando-se como um desafio terapêutico devido a sua baixa responsividade à quimioterapia. Os fármacos quimioterápicos utilizados na terapêutica para tumores cerebrais são altamente lipofílicos (nitrosuréias, temozolomida) e capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (Brigger et al., 2004). A BBB representa um enorme obstáculo para diversos fármacos, incluindo os antibióticos, agentes antineoplásicos e uma variedade de fármacos com atividade no SNC (Aktas et al., 2005). Uma possibilidade concreta de atravessar essa barreira é a utilização de nanopartículas, buscando a vetorização de fármacos ao cérebro (Calvo et al., 2001; Brigger et al., 2002b).

Nos últimos anos, materiais biodegradáveis nanoestruturados para aplicações nas diversas áreas biomédicas, principalmente os carreadores de fármacos, biossensores e biomarcadores têm sido foco de intensos estudos (Emerich et al., 2006; Emerich et al., 2007). Na área farmacêutica os principais objetivos com carreadores de fármacos concentram-se em aumentar o controle da liberação, a especificidade e a seletividade ao local de ação do fármaco, bem como a diminuição da dose e de seus efeitos colaterais (Couvreur & Vauthier, 2006). O uso de carreadores de fármacos está direcionado principalmente para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer, principalmente naqueles onde o tratamento ainda é muito limitado, como é o caso dos tumores do SNC. Além disso, mecanismos de encapsulação e liberação de diversas substâncias em sistemas nanoparticulados têm sido extensivamente estudadas por nosso grupo de pesquisa (Guterres et al., 2000; Schaffazick et al., 2003; Pohlmann et al., 2004; Beck et al., 2007; Schaffazick et al., 2007; Poletto et al., 2007).

Considerando que há relatos que o α -bisabolol apresenta efeito citotóxico sobre linhagens celulares de gliomas (Cavaliere et al., 2004) nossa hipótese considerou que nanocápsulas poliméricas contendo α -bisabolol, indometacina e éster etílico de indometacina poderiam apresentar maior citotoxicidade frente as células de glioma em comparação as respectivas substâncias em solução.

Neste contexto, preparamos nanocápsulas em que a cavidade oleosa, a qual é estruturalmente necessária, é formada por um componente ativo (α -bisabolol), o que adiciona efeito terapêutico à formulação. As suspensões preparadas apresentaram um reflexo azulado resultante do movimento browniano das nanopartículas em suspensão, característica já reportada em outras nanopartículas preparadas por nosso grupo de pesquisa (Guterres et al., 2000; Schaffazick et al., 2003). A avaliação do diâmetro médio das partículas preparadas resultou em um pico submicrométrico (próximo a 200 nm) e este dado é concordante com os encontrados na literatura para partículas preparadas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados (Michalowski et al., 2004). Além disso, a análise de NTA para a formulação de nanocápsulas contendo α -bisabolol/indometacina e éster etílico de indometacina mostrou um diâmetro médio de 192 nm, bastante similar ao diâmetro encontrado pela análise de PCS, o que sugere que os dois métodos podem ser intercambiáveis para estas nanopartículas.

A análise da estabilidade física da suspensão de nanocápsulas é essencial para conhecermos a tendência a instabilidade da formulação. Para tanto realizamos a análise do retroespalhamento de luz da formulação de nanocápsulas contendo α -bisabolol/indometacina e éster etílico de indometacina, e como resultado obtivemos pequena variação da luz retroespalhada durante a análise ao longo da cubeta, demonstrando que não há tendência da formulação preparada a fenômenos de instabilidade como sedimentação das partículas, migração de partículas à superfície ou coalescência nas condições estudadas.

No presente estudo realizou-se também a investigação do efeito citotóxico das formulações de nanocápsulas contendo α -bisabolol, α -bisabolol/indometacina, α -bisabolol/éster etílico de indometacina e α -bisabolol/indometacina/éster etílico de indometacina em linhagens celulares de glioma. Nossos resultados mostram que todas as formulações de nanocápsulas bem como as substâncias em solução foram

capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular em comparação as células que não receberam tratamento bem como em comparação as células tratadas com nanocápsulas sem substância carregada. Foi observada nas menores concentrações testadas uma redução significativa na viabilidade celular das formulações de nanocápsulas Abisab-NC (25, 50 e 75 μM), Abisab IndOH-NC (50 e 75 μM), Abisab IndOEt-NC (25, 50 e 75 μM), e Abisab IndOH/IndOEt-NC (25 e 50 μM), as respectivas substâncias em solução. A avaliação da proliferação celular evidenciou que as formulações de nanocápsulas são capazes de reduzir o número de células em comparação com aquelas que não receberam tratamento ou que receberam nanocápsulas que não carregavam as substâncias. Este ensaio também demonstrou que as nanocápsulas contendo α -bisabolol e éster etílico de indometacina, bem como as nanocápsulas contendo as três substâncias foram capazes de reduzir significativamente o número de células em comparação a nanocápsula contendo somente α -bisabolol.

Recentemente, Parashar e colaboradores (2005) mostraram uma parada na fase G2/M em células humanas de neuroblastoma utilizando CAY10404, um inibidor da COX-2 altamente seletivo. Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, um aumento significativo na proporção de células nas fases G0/G1 e G2/M e uma conseqüente diminuição na proporção de células na fase S após 48 h de tratamento com 100 μM de indometacina foi observado, sugerindo uma parada das células nas fases G1 e/ou G2 do ciclo celular. Estes resultados indicam que o efeito antiproliferativo da indometacina em linhagens de células de glioma é, em parte, devido à inibição da progressão do ciclo celular. Outras evidências também ligam o efeito de AINEs ao ciclo celular. Em gliomas, o celecoxibe, um inibidor seletivo da COX-2, exerce efeito antiproliferativo devido à inibição da transcrição de dois componentes essenciais da maquinaria celular, a ciclina A e ciclina B (Kardosh et al., 2004). Em linhagens humanas de câncer de cólon, a indometacina foi capaz de induzir uma parada na fase G2 do ciclo celular de forma p53 dependente, através da indução de p21WAF1/CIP1 e conseqüente inibição de CDK2 and CKD4 (Xu and Zhang, 2005). Uma vez que as linhagens celulares utilizadas no estudo anterior do nosso grupo de pesquisa são p53 positivas, um mecanismo p53 dependente pode estar envolvido na parada do ciclo celular observada.

Cavalieri e colaboradores (2004) realizaram análise em citômetro de fluxo a fim de avaliar o efeito do α -bisabolol sobre o ciclo celular. Este estudo observou o aparecimento de um pico apoptótico em linhagens T67 e U87, obtendo uma porcentagem de 30% em pico sub-G1 para a linhagem U87 após 24 h de tratamento com 6 μ M de α -bisabolol. No presente estudo avaliamos o efeito de formulações de nanocápsulas contendo indometacina, éster etílico de indometacina e α -bisabolol sobre o ciclo celular de células da linhagem C6. Nós observamos uma intensa diminuição na população celular na fase G0/G1, seguida por uma significativa formação de pico sub-G1 quando as células foram tratadas com as formulações de nanocápsulas para as duas concentrações analisadas (50 e 250 μ M). As células tratadas com 50 μ M das formulações de nanocápsulas contendo α -bisabolol, α -bisabolol/indometacina, α -bisabolol/éster etílico de indometacina e α -bisabolol/indometacina/éster etílico de indometacina apresentaram a formação de um pico sub-G1 com porcentagens entre 48,88 – 88,44 %. As células tratadas com 250 μ M das mesmas formulações de nanocápsulas mostraram picos sub-G1 ainda maiores, porém inquantificáveis. Nas células tratadas com DMSO ou nanocápsulas sem as substâncias, a formação do pico em sub-G1 não foi observado. Os resultados sugerem que as formulações contendo as substâncias nanoencapsulados provocam alteração no ciclo celular das células de glioma, seguidas por indução da morte celular por apoptose.

É amplamente aceito que a apoptose é preferida à necrose como mecanismo de morte para células tumorais, uma vez que não induz um processo inflamatório. A necrose é um processo patológico que ocorre quando as células são expostas a um insulto químico ou físico. A literatura reporta que compostos capazes de induzir um efeito antiproliferativo em células tumorais sem promover morte celular por necrose, são considerados bons candidatos a fármaco antitumoral. No presente estudo, observamos que uma concentração de 50 μ M das formulações de nanocápsulas (Abisab- NC, Abisab/IndOH- NC, Abisab/IndOEt- NC or Abisab/IndOH/IndOEt- NC), foram suficientes para promover um efeito antiproliferativo em células de linhagem de glioma sem promover necrose.

Um problema corrente dos fármacos utilizados na quimioterapia do câncer é a sua toxicidade não específica contra células normais ou tumorais. Devido à ação

tóxica sobre as células normais, são limitadas as doses dos fármacos anticâncer a serem administradas (Kim and Lee, 2001). Objetivando avaliar a seletividade do efeito citotóxico das formulações de nanocápsulas preparadas sobre células de glioma, culturas organotípicas de hipocampo foram utilizadas como modelo de células neurais normais. Desta forma, um importante achado do presente estudo foi que apesar de uma concentração de 25 μM das formulações de nanocápsulas contendo α -bisabolol, α -bisabolol/indometacina, α -bisabolol/éster etílico de indometacina e α -bisabolol/indometacina/éster etílico de indometacina ter demonstrado ser uma concentração suficiente para causar inibição da viabilidade celular, uma concentração dez vezes maior (250 μM), não causou morte celular nas culturas organotípicas. Estes resultados indicam uma citotoxicidade seletiva destas formulações sobre as células tumorais, o que pode ser explicado, ao menos em parte, pelo acelerado metabolismo das células de glioma, pela sua alta taxa de divisão celular e pela atividade endocitótica aumentada, o que proporciona um incremento na internalização das nanocápsulas.

Deve ser ressaltado que um dos fármacos com maior efetividade utilizado na clínica para o tratamento de gliomas, a carmustina, em uma concentração correspondente a LD_{10} (13 mg/kg), não é capaz de causar 100% de morte celular em célula de glioma *in vitro* (Rosenblum et al., 1983; Young, 1989). Uma vez que o arsenal terapêutico disponível atualmente para o tratamento dos glioblastomas é incapaz de alterar substancialmente o prognóstico destes pacientes, justificam-se esforços no intuito de desenvolver e aprimorar abordagens inovadoras. Dessa forma, embora o α -bisabolol e a indometacina não sejam agentes utilizados no tratamento de tumores cerebrais, nossos resultados demonstram que as formulações de nanocápsulas contendo estas substâncias ativas podem ser consideradas potenciais candidatas para o tratamento do glioma, uma vez que apresentam citotoxicidade comprovada e potencial capacidade de vetorizar as substâncias ao SNC. Buscando avaliar um possível efeito sinérgico entre as três substâncias estudadas, uma adequação de suas concentrações faz-se necessária, de forma que suas proporções na nanocápsula sejam ajustadas. Esse ajuste incluí a escolha de um óleo inerte para compor a cavidade oleosa da nanocápsula

juntamente com o α -bisabolol a fim de diluí-lo na partícula, obtendo-se uma proporção mais equilibrada das três substâncias. Além disso, é importante ressaltar que estudos *in vitro* são limitados e investigações futuras utilizando um modelo *in vivo* de glioma apresentam-se úteis em confirmar se há vetorização das substâncias nanocarreadas em comparação as substâncias administradas na sua forma livre, os efeitos distintos das formulações de nanocápsulas sobre células normais e tumorais, bem como determinar as doses apropriadas para a terapia de gliomas.

CONCLUSÕES

Gerais:

Os resultados do presente estudo demonstram que as formulações de nanocápsulas contendo α -bisabolol, indometacina e éster etílico de indometacina podem ser consideradas potenciais candidatas para o tratamento dos gliomas.

Específicas:

- ✓ Foi possível preparar com sucesso nanocápsulas em que a cavidade oleosa, estruturalmente necessária, é formada por um óleo com efeito citotóxico, o α -bisabolol.
- ✓ As formulações de nanocápsulas preparadas apresentaram-se eficazes em reduzir a viabilidade e a proliferação celular em linhagens de glioma.
- ✓ O efeito citotóxico observado pelas formulações de nanocápsulas foi seletivo para as células tumorais como evidenciado pela ausência de toxicidade sobre culturas organotípicas de hipocampo de ratos.
- ✓ Os resultados sugerem que a apoptose foi o mecanismo celular de morte induzida pelas formulações de nanocápsulas contendo as substâncias ativas nanoencapsuladas.

PERSPECTIVAS

Como continuação desse trabalho, pretende-se trabalhar com os seguintes objetivos:

- ✓ Adequar as concentrações das substâncias ativas na formulação de nanocápsulas previamente preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado.
- ✓ Caracterizar as formulações determinando o diâmetro das partículas, polidispersão, potencial zeta, pH e teor de indometacina e éster de indometacina.
- ✓ Investigar o efeito citotóxico/antiproliferativo das novas formulações através de experimentos de viabilidade e proliferação celular, avaliando a possibilidade do tratamento com as formulações alterar a progressão do ciclo celular das linhagens de glioma;
- ✓ Estudar o efeito do tratamento de nanocápsulas contendo α -bisabolol, indometacina ou éster etílico de indometacina, bem como nanocápsulas contendo essas três substâncias simultaneamente, sobre o crescimento de gliomas implantados em cérebro de rato (modelo *in vivo*).
- ✓ Realizar análise histopatológica (H&E) desses gliomas para avaliar se o tratamento com as formulações reduz as características de malignidade desses tumores;
- ✓ Determinar através da técnica de imunohistoquímica para Ki67, VEGF e CD31/PECAM-1, se o tratamento com as formulações altera a proliferação celular e/ou a angiogênese desses tumores;
- ✓ Avaliar se o tratamento com as formulações é capaz de aumentar a sobrevivência dos animais implantados com glioma.

REFERÊNCIAS

Abraham MH, Chadha HS, Mitchell RC (1994). Hydrogen bonding 33. Factors that influence the distribution of solutes between blood and brain. *J. Pharm. Sci.* 83:1257-1268.

Ader, J., Carré, F., Dinh-Xuan, A., T., *et al.*(2006). Fisiologia. Ed. Guanabara-Koogan. RJ.

Ahmad M, Zhang Y, Liu H, Rose ME, Graham SH (2009). Prolonged opportunity for neuroprotection in experimental stroke with selective blockade of cyclooxygenase-2 activity. *Brain Res.* 279:168-173.

Alder-Moore J (1994). AmBisome targeting to fungal infections. *Bone Marrow Transplant* 5:S3-S7.

Alsalameh S, Burian M, Mahr G, Woodcock BG, Geisslinger G (2003). Review article: the pharmacological properties and clinical use of valdecixib, a new cyclooxygenase-2-selective inhibitor. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17:489-501.

Alvarez-Romám R, Barré G, Guy RH, Fessi H (2001). Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm Biopharm.* 2:191-195.

Ambrosi A, Khalansky AS, Yamamoto H, Gelperina SE, Begley DJ, Kreuter J (2006). Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [14C]- poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastoma-bearing rats. *J. Drug Target* 14:97-105.

Ammoury N, Fessi H, Devissaguet JP, Dubrasquet M, Benita S (1991). Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(D,L-lactide) and poly(isobutyl-cyanoacrylate) nanocapsules in rats. *Pharm. Res.* 8:101-105.

Andersen, AP. (1978). Postoperative irradiation of glioblastomas. Results in a randomized series. *Acta Radiol Oncol Radiat Phys Biol*; 17:475.

Aschner M (1998). Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicol. Lett.* 102:283-287.

Auguste P, Gürsel DB, Lemièrre S, Reimers D, Cuevas P, Carceller F, Di Santo JP, Bikfalvi A (2001). Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res.* 4:1717-1726.

Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A, Battastini AM (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* 319:61- 68.

Baylac S, Racine P (2003) Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *Int J Aromather* 13:138–142

Béduneau A, Saulnier P, Benoit JP (2007). Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials* 28:4947-4967.

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

Bernardi A, Jacques-Silva MC, Delgado-Cañedo A, Lenz G, Battastini AMO (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma cell line. *Eur. J. Pharm.* 532: 214-222.

Bernardi A, Bavaresco L, Wink MR, Jacques-Silva MC, Delgado-Cañedo A, Lenz G, Battastini AMO (2007). Indomethacin stimulates activity and expression of ecto- 5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell lines. *Eur. J. Pharm.* 569:8-15.

Bernardi, A., Frozza, L.R., Jager, E., Figueiró, F., Bavaresco, L., Salbego, C., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Battastini, A. (2008). Selective cytotoxicity of indomethacin ethyl Ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. *European Journal of Pharmacology.*

Bernardi A, Braganhol E, Jäger E, Figueiró F, Edelweiss MI, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AMO. (2009a). Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Letters*, 281(1): 53-63.

Bernardi, A. (2009) Nanocápsulas contendo indometacina: avaliação dos efeitos antitumoral, neuroprotetor e anti-inflamatório. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS.

Block ML, Zecca L, Hong JS (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 1:57-69.

Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, Kruchko C, McCarthy BJ, Rajaraman P, Schwartzbaum JA, Sadetzki S, Schlehofer B, Tihan T, Wiemels JL, Wrensch M, Buffler PA (2008). Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 113:1953-1968.

Bonina F, Trombeta D, Borzi A, De Pasquale A, Saija A (1997). 1-ethylazacycloalkan-2-one indomethacin esters as new oral pro-drugs: chemical stability, enzymatic hydrolysis, anti-inflammatory activity and gastrointestinal toxicity. *Int. J. Pharm.* 156:245-250.

Bory C, Bouliou R, Souillet G, Chantin C, Guibaud P, Hershfield MS (1991). Effect of polyethylene glycol-modified adenosine deaminase (PEG-ADA) therapy in two ADA-deficient children: measurement of erythrocyte deoxyadenosine triphosphate as a useful tool. *Adv. Exp. Med. Biol.* 309A, 173-176.

Botting RM (2006). Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J. Physiol. Pharm.* 5:113-124.

Braganhol E, Tamajusuku AS, Bernardi A, Wink MR, Battastini AM. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line (2007). *Biochim. Biophys. Acta.* 1770:1352 -1359.

Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppel D, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AM (2009). Selective NTPDase2 expression modulates *in vivo* rat glioma growth. *Cancer Sci.*100:1434 -1342.

Brigger I, Dubernet C, Couvreur P (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Del. Rev.* 54: 631-651.

Burian M, Geisslinger G (2005). COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol. Ther.* 107:139-154.

Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87:1-5.

Calvo P, Vila-Jato, Alonso MJ (1996). Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles and nanoemulsions as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.* 85:530-536.

Calvo P, Gouritin B, Chacun H, Desmaële D, D'Angelo J, Noel JP, Georgin D, Fattal E, Andreux JP, Couvreur P (2001). Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharm. Res.* 18:1157-1166.

Cavaliere F, Dinkel K, Reymann K (2006). The subventricular zone releases factors which can be protective in oxygen/glucose deprivation-induced cortical damage: an organotypic study. *Exp. Neurol.* 1:66-74.

Cavalieri, E., Mariotto, S., Febrizi, C., Prati, A., Gottardo, R., Leone, S., Berra, L., Lauro, G., Ciampa, A., Suzuki, H. (2004). α -bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

Cavalieri E, Bergamini C, Mariotto S, Leoni S, Perbellini L, Darra E, Suzuki H, Fato R, Lenaz G. (2009). Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in α -bisabolol induced apoptosis. *The Febs Journal*.

Ceresoli GL, Zucali PA, Favaretto AG, Grossi F, Bidoli P, el Conte G, Ceribelli A, Bearz A, Morengi E, Cavina R, Marangolo M, Parra HJ, Santoro AJ (2006). Phase II study of pemetrexed plus carboplatin in malignant pleural mesothelioma. *Clin. Oncol.* 24:1443-1448.

Chicoine MR, Silbergeld DI (1995). Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. *J. Neurosurg.* 4:665-671.

Chintala SK, Tonn JC, Rao JS (1999). Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17:495-502.

- Chopp M, Li Y (2002). Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* 1:92-100.
- Collins VP (2002). Cellular mechanisms targeted during astrocytoma progression. *Cancer Lett.* 188:1-7.
- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE (2001). Beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 21:1179- 1188.
- Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Baudhuin P, Speiser P (1979). Poly(cyanoacrylate) nanoparticles as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 31:331-332.
- Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C (2002). Nanocapsule technology: a review. *Critical Rev.™ in Ther. Drug Carrier Systems* 19:99-134.
- Couvreur P, Vauthier C (2006). Nanotechnology; intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 23:1417-1450.
- Cruz L, Soares LU, Dalla Costa T, Mezzalira G, Silveira NP, Guterres SS, Pohlmann AR (2006). Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 313:198-205.
- Cui JG, Kuroda H, Chandrasekharan NV, Pelaez RP, Simmons DL, Bazan NG, Lukiw WJ (2004). Cyclooxygenas-3 gene expression in Alzheimer hippocampus and in stressed human neural cells. *Neurochem. Res.* 29:1731-1737.
- Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U (1992). Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* 19:5334-5341.
- Dai C, Holland EC (2001). Glioma models. *Biochim. Biophys. Acta* 1551:M19-M27.
- De Keyser J, Sulter G, Luiten PG (1999). Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci.* 22:535- 540.

Deininger MH, Schluesener HJ (1999). Cyclooxygenase-1 and -2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and gliomas. *J. Neuroimmunol.* 95:202-208.

Dinarello CA (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* 118:503-508. 143

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999). Pathobiology of ischemia stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22:391-397.

Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP (1991). Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.* 51:2164-2172.

Eligini S, Barbieri SS, Cavalca V, Camera M, Brambilla M, De Franceschi M, Tremoli E, Colli S (2005). Diversity and similarity in signaling events leading to rapid Cox-2 induction by tumor necrosis factor-alpha and phorbol ester in human endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 65:683-693.

Emerich DF, Thanos CG (2006). The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. *Biomol. Eng.* 23:171-184.

Emerich DF, Thanos CG (2007). Target nanoparticle-based drug delivery and diagnosis. *J. Drug. Target* 15:163-183.

Faraji AH, Wipf P (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Med. Chemistry* 17:2950-2962.

Fattal E, Vauthier C (2002). Nanoparticles as drug delivery systems. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 1864-1882.

Fattal E, Andrieux A, Barratt G, Couvreur P, Labarre D, Ponchel G, Vauthier C (2007). Recent advances in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for drug delivery. *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications* Edited by Domb J, Tabata Y, Ravi Kumar MNV and Farber S. 213-232.

Fawaz F, Bonini F, Guyot M, Laguény AM, Fessi H, Devissaguet JP (1993). Influence of poly(DL-lactide) nanocapsules on the biliary clearance and enterohepatic circulation of indomethacin in the rabbit. *Pharm. Res.* 10:750-756.

Fawaz F, Bonini F, Guyot M, Lagueny AM, Fessi H, Devissaguet JP (1996). Disposition and protective effect against irritation after intravenous and rectal administration of indomethacin-loaded nanocapsules to rabbits. *Int. J. Pharm.* 133:107-115.

Feldkamp MM, Lau N, Guha A (1997). Signal transduction pathways and their relevance in human astrocytomas. *J. Neurooncol.* 35:223-248.

Ferrara N (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25:581-611.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Amoury N, Benita S (1989). Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 113:r1-r4. Fiorucci S, Antonelli E (2001). Cyclooxygenase isoenzymes: structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase by anti-inflammatory agents. *Digest. Liver Dis.* 33:S2-S7.

Fomchenko EI, Holland EC (2006). Origins of brain tumors – a disease of stem cells? *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 6:288-189.

Friedman HS, Kerby T and Calvert H (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* 6:2585-2597.

Frezza RL, Horn AP, Hoppe JB, Simão F, Gerhardt D, Comiran R, Salbego C (2008). A comparative study of beta-amyloid peptides A β 1-42 and A β 25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem. Res.* 34:295-303.

Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M, Chan PH (1998). Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18:1239-1247.

Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94:715–725.

Gähwiler BH (1981). Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 4:329-342.

Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P (2005). Colloidal carriers and bloodbrain (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? *Int. J. Pharm.* 298:274-292.

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N (1998a). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273:13313-13316.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998b). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 273:30336-30043.

Giani C, Finocchiaro G (1994). Mutation rate of the CDKN2 gene in malignant glioma. *Cancer Res.* 54:6338-6339.

Gilman S (2006). Pharmacological management on ischemic stroke: relevance to stem cell therapy. *Exp. Neurol.* 199:28-36.

Ginsberg MD (2008). Neuroprotection for ischemic stroke; past, present and future. *Neuropharm.* 55:363-389.

Girolami V. O Sistema Nervoso Central. In: Contran RS, Kumar V, Collins. Robins Patologia estrutural e funcional. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Glantz MJ, Jaeckle KA, Chamberlain MC, Phuphanich S, Recht L, Swinnen LJ, Maria BL, LaFollette S, Schumann GB, Cole B F, Howell SB (1999a). A randomized controlled trial comparing intrathecal sustained-release cytarabine (DepoCyt) to intrathecal methotrexate in patients with neoplastic meningitis from solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 5:3394-3402.

Glantz MJ, LaFollette S, Jaeckle KA, Shapiro W, Swinnen L, Rozental JR, Phuphanich S, Rogers LR, Gutheil JC, Batchelor T, Lyter D, Chamberlain M, Maria BL, Schiffer C, Bashir R, Thomas D, Cowens W, Howell SB (1999b). Randomized trial of a slow-release versus a standard formulation of cytarabine for the intrathecal treatment of lymphomatous meningitis. *J. Clin. Oncol.* 17:3110-3116.

Glue P, Pouzier-Panis R, Raffenel C, Sabo R, Gupta SK, Salfi M, Jacobs S, Clement RP (2000). A dose ranging study of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin in chronic hepatitis C. The Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Hepatology* 32:647-653.

Graham SH, Chen J (2001). Programmed cell death in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21:99-109.

Granado M, Priego T, Martín AI, Villanúa MA, López-Calderón A (2005). Antiinflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288:E486-E492.

Guterres SS, Fessi H, Barratt G, Puisieux F, Devissaguet JP (1995). Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs : gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. *Pharm. Res.* 10 :1545-1547.

Guterres SS, Fessi H, Barratt G, Puisieux F, Devissaguet JP (2000). Poly(rac-lactide) nanocapsules containing diclofenac: protection against muscular damage in rats. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11:1347-1355.

Guterres SS, Muller CB, Michalowski CB, Pohlmann AR, Dalla Costa T (2001). Gastro-intestinal tolerance after oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *STP Pharm. Sci.* 11: 229-233.

Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR (2007). Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drugs Target Insights* 2:147-157.

Gray, P.A., Warner, T.D., Vojnovic, I., Del Soldato, P., Parikh, A., Scadding, G.K., Mitchell, J.A. (2002). Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs on ciclo-oxygenase and lipoxigenase activity in whole blood from aspirin-sensitive asthmatics vs healthy donors. *British Journal of Pharmacology.* V. 137, p. 1031-1038

Grobben B, DE Dey PP, Slegers H (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.* 310:257-270.

Haddad JJ (2002). Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:700-713.

- Hailer NP, Vogt C, Korf HW, Dehghani F (2005). Interleukin-1 beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* 9:2347-2360.
- Hallenbeck JM (2002). The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat. Med.* 8:1363-1368.
- Han HS, Yenari MA (2003). Cellular targets of brain inflammation in stroke. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4:522-529.
- Harris RE (2009). Cyclooxygenase-2 (COX-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacol.* 17:55 – 67.
- He F, Sun YE (2007). Glial cells more than support cells? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:661-665.
- Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN (2000). Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nature Genet.* 25:55-57.
- Holland EC (2001). Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat. Rev. Gen.* 2:120-129.
- Holopainen IE (2005). Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochem. Res.* 30:1521-1528.
- Hopkins SJ (2003). The pathophysiological role of cytokines. *Leg. Med. (Tokyo)* 1:S45-S57.
- Horn AP, Gerhardt D, Geyer AB, Valentim L, Cimarosti H, Tavares A, Horn F, Lenz G, Salbego C (2005). Cellular death in hippocampus in response to PI3K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochem. Res.* 3:355-361.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AMC, Dannenberg AJ (2001). Cyclooxygenase-2: a targeted for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine-related Cancer* 8:97 – 114.

Huang J, Hupadhyay UM, Tamargo RJ (2006). Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg. Neurol.* 66:232-245.

Hyde CAA, Missailidis S (2009). Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 9: 701–715.

Ishibashia M, Bottone FG, Taniurab S, Kamitanib H, Watanabeb T, Eling TE (2005). The cyclooxygenase inhibitor indomethacin modulates gene expression and represses the extracellular matrix protein laminin g1 in human glioblastoma cells. *Exp. Cell Res.* 302: 244 – 252.

Jacobs JWG, Bijlsma JWJ (1997). NSAIDs: a critical appraisal. *Netherlands J. Med.* 51:198-204.

Jäger A, Stefani V, Guterres SS, Pohlmann AR (2007). Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *Int. J. Pharm.* 338:297-305.

Jain RK (1997). *Transport of molecules in the tumor interstitium: a review.* *Cancer Res.* 47:3039-3051.

Joe B, Wilder RL (1999). Animal models of rheumatoid arthritis. *Mol. Med. Today* 5:367-369.

Joki T, Heese O, Nikas DC (2000). Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human gliomas and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res.* 60: 4926-4931.

Juillerat-Jeanneret L (2008). The targeted delivery of cancer drugs across the blood–brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug Discov. Today* 13:1099-1106.

Kalgutkar AS, Marnett AB, Crews BC, Remmel RP, Marnett LJ (2000). Ester and amide derivatives of the nosteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin, as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *J. Med. Chem.* 43:2860-2870.

Kang KB, Wang TT, Woon CT, Cheah ES, Moore XL, Zhu C, Wong MC (2007). Enhancement of glioblastoma radioresponse by a selective COX-2 inhibitor

celecoxib: inhibition of tumor angiogenesis with extensive tumor necrosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 3:888-896.

Kim SY, Lee YM, Shin HJ, Kang JS (2001). Indomethacin-loaded methoxy poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) diblock copolymeric nanosphere: pharmacokinetic characteristics of indomethacin in the normal Sprague-Dawley rats. *Biomaterials* 22:2049-2056.

Kim WY, Lee HY (2009). Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: mechanism and therapeutic intervention in brain tumors. *FEBS J.* 276:4653-4664.

Kirino T (2000). Delayed neuronal death. *Neurophatology* 20:S95-S97.

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* 3:255-268.

Klimiuk PA, Yang H, Goronzy JJ, Weyand CM (1999). Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin. Immunol.* 90:65-78.

Kondo T (2006). Brain cancer stem-like cells. *Eur. J. Cancer* 42:1237-1242.

Konopka G, Bonni A (2003). Signaling pathways regulating gliomagenesis. *Curr. Mol. Med.* 3:73-84.

Koul D (2008). PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol. & Therapy* 7:1321-1325.

Koziara JM, Lockman PR, Allen DD, Mumper RJ (2003). *In situ* blood-brain barrier transport of nanoparticles. *Pharm. Res.* 20:1772-1778.

Kreuter J, Alyautdin RN, Kharkevich DA, Ivanov AA (1995). Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res.* 674:171-174.

Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ramge P, Cychutek K, Koch-Brandt C, Alyautdin R (2002). Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle bound drugs across the blood-brain barrier. *J. Drug Target* 10:317-325.

Kreuter J, Ramge P, Petrov V, Hamm S, Gelperina SE, Engelhardt B, Alyautdin R, von Briesen H, Begley DJ (2003). Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm. Res.* 20:409-416.

Krishna R, Mayer LD (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer – mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Cancer Sci.* 11:265-283.

Lakka SS and Rao JS (2008). Antiangiogenic therapy in brain tumors. *Expert Rev. Neurother.* 10:1457-1473.

Lamprecht A, Rodero Torres H, Schäfer U, Lehr CM (2000a). Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease. *J. Control Release* 2000 69:445-454.

Lamprecht A, Ubrich N, Hombreiro Pérez M, Lehr C, Hoffman M, Maincent P (2000b). Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. *Int. J. Pharm.* 196:177-182.

Laufer S (2003). Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15:623-627.

Laws ER Jr, Shaffrey ME (1999). The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17:413-4120.

Lee CC, MacKay JA, Frechet JM, Szoka FC (2005a). Designing dendrimers for biological applications. *Nat. Biotechnol.* 23:1517-1526.

Lee JH, Canny MD, Erkenez A, Krilleke D, Ng YS, Shima DT, Pardi A, Jucker F (2005b). A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:18902-18907.

Levick JR (2000). Hypoxia and acidosis in chronic inflammatory arthritis: relation to vascular supply and dynamic effusion pressure. *J. Rheumatol.* 17: 579-582.

Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yarden Y, Schlessinger J, Soreq H (1984). Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res.* 44:753-760.

Lipton P (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79:1431-1568.

Lu Y, Chen SC (2004). Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 22:1621-1633.

Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2008). Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J. Neurooncol.* 1:31-45.

Maderna E, Salmaggi A, Calatozzolo C, Limido L, Pollo B (2007). Nestin, PDGFRbeta, CXCL12 and VEGF in Glioma Patients: different profiles of (pro153 angiogenic) molecule expression are related with tumor grade and may provide prognostic information. *Cancer Biol. Ther.* 7:1018-1024.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15:1311-1333.

Mao Y, Zhou L, Zhu W, Wang X, Yang G, Xie L, Mao X, Jin K (2007). Proliferative status of tumor stem cells may be correlated with malignancy grade of human astrocytomas. *Front. Biosci.* 12:2252-2259.

Marty JJ, Oppenheim RC, Speiser P (1978). Nanoparticles: A new colloidal drug delivery systems. *Pharm. Acta Helv.* 53:17-23.

Matsuo M, Yanemitsu N, Zaito M (2001). Expression of prostaglandin H synthase-2 in human brain tumors. *Acta Neuropathol.* 102:181-187.

Mazeron JJ, Kantor G (1998). Radiotherapy in stereotactic conditions (radiosurgery) in malignant brain tumors: clinical research. *Cancer Radiotherapy* 2:215-217.

Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ (1997). Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:8104-8109.

Minghetti L (2007). Role of COX-2 in inflammatory and degenerative brain diseases. *Subcell. Biochem.* 42:127-141.

Ministério da Saúde Brasil (2009). Saúde Brasil 2007 - Uma análise da situação da Saúde: Perfil da mortalidade do brasileiro. Brasília, 06 de novembro de 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletivasaude061008.pdf>. Acesso em: 25 de outubro de 2010.

Mitani A, Yanase H, Sakai K, Wake Y, Kataoka K (1993). Origin of intracellular Ca²⁺ elevation induced by in vitro ischemia-like condition in hippocampal slices. *Brain Res.* 601:103-110.

Mora-Huertas C.E, Fessi, H, Elaissari A (2010). Polymer-baser nanocapsules for drug delivery. *Inter. J. Pharma.* 385: 113-142

Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MA, Lenz G, Battastini AMO (2006). *In vivo* glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer* 6:226.

Mousseau M, Chauvin C, Nissou MF, Chaffanet N, Plantaz D, Pasquier B, Schaerer R, Benabid A (1993). A study of the expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumors. *Eur. J. Cancer* 29A:753- 759.

Nakamura M, Watanabe T, Klangby U Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001). *p14ARF* deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol.* 11:159–168.

Nantel F, Denis D, Gordon R, Northey A, Cirino M, Metters KM, Chan CC (1999). Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carragenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 128:853-859.

Northfelt DW, Martin FJ, Working P, Volberding PA, Russell J, Newman M, Amantea MA, Kaplan LD (1996). Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-

bound polyethylene glycol: pharmacokinetic, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Pharmacol.* 36, 55-63.

Nyman DW, Campbell KJ, Hersh E, Long K, Richardson K, Trieu V, Desai N, Hawkins MJ, Von Hoff DD (2005). Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* 23:7785-7793.

Ohgaki H (2005). Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathol.* 25:1-7.

Ohgaki H, Kleihues P (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 170:1445-1453.

Ohgaki H, Kleihues P (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *In press.*

Olsen E, Duvic M, Frankel A, Kim Y, Martin A, Vonerheid E, Jegasothy B, Wood G, Heald P, Oseroff A, Pinter-Brown L, Bowen G, Kuzel T, Fivenson D, Foss F, Glode M, Molina A, Knobler E, Stewart S, Cooper K, Stevens S, Craig F, Reuben J, Bacha P, Nichols JJ (2001). Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Oncol.* 19:376-388.

Opal SM, DePalo VA (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117:1162-1172.

Paoletti AM, Piccirilli S, Costa N, Rotiroti D, Bagetta G, Nisticò G (1998). Systemic administration of N omega-nitro-L-arginine methyl ester and indomethacin reduces the elevation of brain PGE2 content and prevents seizures and hippocampal damage evoked by LiCl and tacrine in rat. *Exp. Neurol.* 149:349- 355.

Parepally JM, Mandula H, Smith QR (2006). Brain uptake of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: ibuprofen, flurbiprofen, and indomethacin. *Pharm. Res.* 23:873-881.

Pekny M, Nilsson M (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-434.

Peskar BM (2001). Role of cyclooxygenase isoforms in gastrical mucosal defence. *J. Physiol. Paris* 95:3-9.

Petri B, Bootz A, Khalansky A, Hekmatara T, Müller R, Uhl R, Kreuter J, Gelperina S (2007). Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *J. Control. Release* 117:51–58.

Pohlmann AR, Weiss V, Mertins O, Silveira NP, Guterres SS (2002). Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16:305-312.

Pohlmann AR, Soares LU, Cruz L, Silveira NP, Guterres SS (2004). Alkaline hydrolysis as a tool to determine the association form of indomethacin in nanocapsules prepared with poly(epsilon-caprolactone). *Curr. Drug Delivery.* 1:103-110.

Prayson RA, Castilha EA, Vogelbaum MA (2002). Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by immunohistochemistry in glioblastoma multiforme. *Ann. Diag. Pathol.* 6:148-153.

Price DL (1999). New order from neurological disorders. *Nature* 399:A3-A5. Quintão NL, Ferreira J, Beirith A, Campos MM, Calixto JB (2008). Evaluation of the effects of the herbal product Catuama in inflammatory and neuropathic models of nociception in rats. *Phytomedicine* 15:245-252.

Pusieux, F.; Barrat, G., Couarraze, G., Couvreur, P., Devissaguet, J-P.; Dubernet, C.; Fattal, E; Fessi, H.; Vauthier, C.; Benita, S. (1994). Em Polymeric Biomaterials; Dumitriu, S., Ed.; Marcel Dekker: New York, cap, 16.

Rao CN, Lakka SS, Kin Y, Konduri SD, Fuller GN, Mohanam S, Rao JS (2001). Expression of tissue factor pathway inhibitor 2 inversely correlates during the progression of human gliomas. *Clin. Cancer Res.* 3:570-576.

Ravi Kumar MN (2000). Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J. Pharm. Sci.* 3:234-258.

Reynolds JEF (Ed.). Martindale The Extra Pharmacopeia. Londres Pharmaceutical Press, 40 ed., 1993.

Rich JN, Bigner DD (2004). Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:430-446.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Fay MP, Feuer EJ, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001, National Cancer Institute. Bethesda, MD, seer.cancer.gov/csr/1975_2001, 2004.

Robbins and Cotran. (1999). Pathologic bases of disease. Ed. Revista de Robbins Pathologic basis of disease.

Robinson K, Kenefeck R, Pidgeon EL, Shakib S, Patel S, Polson RJ, Zaitoun AM, Atherton JC (2008). Helicobacter pylori-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. *Gut* 10:1375-1385.

Roney C, Kulkarni P, Arora V, Antich P, Bonte F, Wu A, Mallikarjuna NN, Manohar S, Liang HF, Kulkarni AR, Sung HW, Sairam M, Aminabhavi TM (2005). Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *J. Control Release* 108:193-214.

Rooprai HK, Vanmeter T, Panou C, Schnüll S, Trillo-Pazos G, Davies D, Pilkington GJ (1999). The role of integrin receptors in aspects of glioma invasion in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17:613-623.

Rosen O, Muller HJ, Gokbuget N, Langer W, Peter N, Schwartz S, Hahling D, Hartmann F, Ittel TH, Muck R, Rothmann F, Arnold R, Boos J, Hoelzer D (2003). Pegylated asparaginase in combination with high-dose methotrexate for consolidation in adult acute lymphoblastic leukaemia in first remission: a pilot study. *Br. J. Haematol.* 123, 836-841.

Sacca R, Cuff CA, Ruddle NH (1997). Mediators of inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 9:851-857.

Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS (2005). Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med.* 353:811-822.

Sathornsumetee S, Reardon D, Desjardins A, Quinn J, Vredenburgh JJ, Rich JN (2007). Molecularly targeted therapy for malignant gliomas. *Cancer* 110: 113-124.

Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* 26:726-737.

Schaper W, Buschmann I (1999). VEGF and therapeutic opportunities in cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:541-543. Scheffel U, Rhodes BA, Natarajan TK, Wagner HN (1972). Albumin microspheres for the study of the reticulo-endothelial system. *J. Nucl. Med.* 13:498-503.

Schiffer D, Manazza A, Tamagno I (2006). Nestin expression in neuroepithelial tumors. *Neurosci. Lett.* 400:80-85.

Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 9:494-503.

Szejtli J., Szente L., Kormoczy G., Tetenyi P., David A., Zilahy T., Kelemen A., Harshegyi J. (1980). Cyclodextrin-Kamilien-inklusionskomplex. Verfahren zur

Herstellung der Komplexe und die Komplexe enthaltenden Praeparate, German patent 2944350.

Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512.

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

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845.

Siena S, Piccart MJ, Holmes FA, Glaspy J, Hackett J, Renwick JJ (2003). A combined analysis of two pivotal randomized trials of a single dose of pegfilgrastim per chemotherapy cycle and daily Filgrastim in patients with stage II-IV breast cancer. *Oncol. Rep.* 10:715-724.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 409:396-401.

Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A (2004). Poly epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. J. Pharm.* 278 :1-23.

Skibo GG, Nikonenko IR, Savchenko VL, McKanna JA (2000). Microglia in organotypic hippocampal slice culture and effects of hypoxia: ultrastructure and lipocortin-1 immunoreactivity. *Neuroscience* 96:427-438.

Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 70:1-20.

Srinath P, Diwan PV (1998). Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of lipid microspheres of indomethacin. *Pharm. Acta Helvetiae* 73:199-203.

Sriram K, O'Callaghan JP (2007). Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2:1401-53.

Stein C, Millan MJ, Herz A (1988). Unilateral inflammation of the hind paw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2:455-451.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37:173-182.

Strassburger M, Braun H, Reymann KG (2008). Anti-inflammatory treatment with the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB239063 is neuroprotective, decreases the number of activated microglia and facilitates neurogenesis in oxygen-glucose-deprived hippocampal slice cultures. *Eur. J. Pharmacol.* 592:55-61.

Stronjinik T, Rosland GV, Sakariassen PO, Kavalar R, Lah T (2007). Neural stem cells markers, nestin, and musashi proteins in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surgical. Neurol.* 68:133- 143.

Stupp, R, Hegi, ME, Mason, WP, et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10:459.

Sugino T, Nozaki K, Hashimoto N (2000). Activation of mitogen-activated protein kinases in gerbil hippocampus with ischemic tolerance induced by 3- nitropropionic acid. *Neurosci. Lett.* 278:101-104.

Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh Y-H (2009). Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiol.* 87:133-170.

Takano T, Lin JHC, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard MM (2001). Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med.* 7:1010-1015.

Tandle A, Blazer DG III, Libutti SK (2004). Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *J. Transl. Med.* 2:22.

Tang P, Steck PA, Yung WK (1997). The autocrine loop of TGF- α /EGFR and brain tumors. *J. Neurooncol.* 35:303-314.

Tavares A, Cimarosti H, Valentim L, Slabego C (2001). Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroreport* 12:2705-2709.

Thoss M., Schwabe L., Froemming K.H. (1994). Storage and photostability of cyclodextrin inclusion compounds of lemon, orange, hop and chamomile oil, *Pharmazie* 49, 252–257.

Tobío, M., Gref, R., Sánchez, A., Langer, R., Alonso, A.J., 1998. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharm. Res.*, 15 (2), 270-275.

Tomisato W, Tsutsumi S, Hoshino T, Hwang HJ, Mio M, Tsuchiya T, Mizushima T (2004). Role of direct cytotoxic effect of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochem. Pharm.* 67:575-585.

Toomey DP, Murphy JF, Conlon KC (2009). COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. *Surgeon.* 7:174-80.

Tratsk KS, Campos MM, Vaz ZR, Filho VC, Schlemper V, Yunes RA, Calixto JB (1997). Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drymis winteri*. *Inflamm. Res.* 46:509-514.

Valo GP, Dunn CJ, Giroud JP, Timsit J, Willoughby DA (1973). Distribution of prostaglandins in inflammatory exudates. *J. Pathol.* 111:149-158.

Vane JR, Botting RM (1996). Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scaand. J. Rheumatol. Suppl.* 102:9-21.

Vauthier C, Dubernet C, Chauvierre C, Brigger I, Couvreur P (2003). Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl-cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Control. Release* 93:151-160.

Vila N, Chamorro A, Castillo J, Davalos A (2001). Glutamate, interleukin-6, and early clinical worsening in patients with acute stroke. *Stroke* 32:1234-1237.

Vila N, Castillo J, Davalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro A (2003). Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke* 34:671-675.

Villano JL, Seery TE, Bressler LR (2009). Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer Chemother. Pharm.* 64:647-655.

Vinogradov SV, Bronich TK, Kabanov AV (2002). Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:135-147.

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE II, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Wagner M, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS (2007). Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* 13:1253-1259.

Wannamacher L e Ferreira MBC. Antiinflamatórios não-esteróides In: Fuchs FD, Wannamacher L, Ferreira MBC. Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica nacional, 3 ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

Wang M, Yoshida D, Liu S, Teramoto A (2005). Inhibition of cell invasion by indomethacin on glioma cell lines: in vitro study. *J. Neuro-Oncol.* 72:1-9.

Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007). The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol.* 184:53-68.

Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 6:217-224.

Weinberg RA (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.

Wheeler-Jones C, Abu-Ghazaleh R, Cospedal R, Houliston RA, Martin J, Zachary I (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett.* 420:28-32.

White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 179:1-33.

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM (2004). Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol. Life Sci.* 61:2510-2522.

Williams CS, Mann M, DuBois RN (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 55:7908-7916.

Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartzmann G, Sarkis JJ, Battastini AM (2003). Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett.* 198:211 - 218.

Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Yongqiang L, Wu XY (2007). Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59:491-504.

Wong ML, Prawira A, Kaye AH, Hovens CM (2009). Tumour angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *J. Clin. Neurosci.* 16:1119-1130.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.

Xiang Z, Hrabetova S, Moskowitz SI, Casaccia-Bonofil P, Young SR, Nimmrich VC, Tiedge H, Einheber S, Karnup S, Bianchi R, Bergold PJ (2000). Long-term maintenance of mature hippocampal slices *in vitro*. *J. Neurosci. Methods* 98:145-154.

Xie Z, Wei M, Morgan TE, Fabrizio P, Han D, Finch CE, Longo VD (2002). Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide 1-42 and lipopolysaccharide-activated microglia. *J. Neurosci.* 22:3484-3492.

Ye ZC, Sontheimer H (1999). Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res.* 59:4383-4391.

Yung WK (2000). Temozolomide in malignant gliomas. *Semin. Oncol.* 27:27-34.

Zhang Z, Feng S (2006). In vitro investigation on poly(lactide)-Tween 80 copolymer nanoparticles fabricated by dialysis method for chemotherapy. *Biomacrom.* 7:1139-1146.

Zheng Z, Yenari MA (2004). Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol. Res.* 26:884-892.

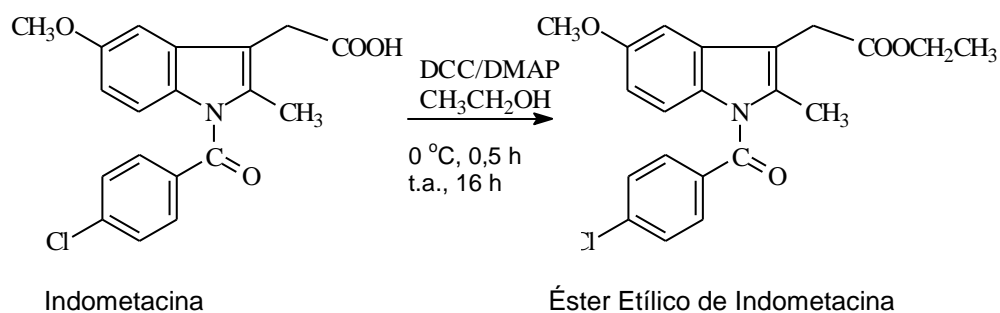
Zou JY, Crews FT (2005). TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res.* 1034:11-24

ANEXO

Obtenção do Éster Etílico de Indometacina

A síntese do éster etílico de indometacina (IndOEt) segue a metodologia descrita por KALGUTKAR e colaboradores (2000) com pequenas adaptações. Em uma solução de indometacina (IndOH) (5,0 mmol) em etanol (20 mL) foi adicionado 0,2 mmol de DMAP. A solução foi resfriada a 0 °C em um balão sob argônio e, após 10 minutos, foi adicionado DCC (5,0 mmol). A reação permaneceu à temperatura de 0 °C por mais 30 minutos e, então, foi mantida à temperatura ambiente por 16 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. Ao final da reação o excesso de solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em diclorometano (30 mL) e a suspensão foi filtrada. O filtrado foi lavado com solução aquosa saturada de NaHCO₃ (3 x 10 mL) e o precipitado de dicitlohexiluréia foi descartado. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente foi evaporado. O produto foi purificado através de coluna cromatográfica (sílica-gel 60, 70-230 mesh), empregando uma mistura de acetato de etila e ciclohexano (1:1 v/v) como eluente.

A preparação consistiu na ativação da IndOH com DCC, que forma um intermediário com bom grupo abandonador. Após a ativação da função ácido carboxílico, a condensação com etanol (usado como reagente em excesso e como solvente) produziu o éster (Esquema 1).



Esquema 1. Síntese do éster etílico de indometacina.

A análise de ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada em Espectrômetro Varian (VXR-200 ou YH-300) à temperatura ambiente, usando o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. O espectro de RMN do ^1H apresentou sinais em 4,16 e 1,27 ppm, correspondentes ao grupo etoxila.

Métodologia Analítica

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi o método empregado para a quantificação da indometacina e de seu éster nas formulações preparadas. Utilizou-se um cromatógrafo Perkin-Elmer S-200, with injector S-200, detector UV-vis, pré- coluna e coluna Nova-Pak C-18 4 μm , 3,9 x 150 mm, Waters. A fase móvel empregada foi preparada com acetonitrila/água (70:30 v/v), tendo seu pH aparente ajustado em 5,0 com ácido acético a 10 % e medido em potenciômetro. O fluxo empregado foi de 0,7 mL/min e o volume de injeção foi de 20 μL . Tanto a indometacina como o éster etílico de indometacina foram detectados em 267 nm.

1. Indometacina

A validação do método de quantificação da IndOH foi realizada por Cruz (2005). A curva de calibração foi obtida na faixa de 1,0 a 25,0 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente de correlação 0,9993. As amostras com concentrações de 3,0 12,0 e 17,0 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram exatidão de 100%. Os dados de repetibilidade e precisão intermediária foram obtidos a partir das mesmas amostras de controle de qualidade e apresentaram coeficientes de variação abaixo de 2 %.

2. Éster etílico de indometacina

A validação do método de quantificação do IndOEt foi realizada por Soares (2003). A curva de calibração foi obtida na faixa de 1,0 a 25,0 $\mu\text{g/mL}$, com coeficiente de correlação 0,9995. As amostras de controle de qualidade com concentrações de 3,0 12,0 e 17,0 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram exatidão de 104,78%, 99,42 % e 100,20 %, respectivamente. Os dados de repetibilidade e precisão intermediária foram obtidos a partir das mesmas amostras de controle de qualidade e apresentaram coeficientes de variação abaixo de 2 %.

3. α -bisabolol

A CLAE foi o método utilizado também para a quantificação do α -bisabolol nas formulações. A fase móvel empregada foi preparada com acetonitrila/água (85:15 v/v), tendo seu pH aparente ajustado em 4,5 com ácido acético a 10 % e medido em potenciômetro. O fluxo empregado foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção foi de 20 μ L. O α -bisabolol foi detectado no comprimento de onda de 207 nm.

A validação da metodologia foi realizada segundo as recomendações da International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH, 2005). Os parâmetros avaliados foram linearidade, exatidão, repetibilidade e precisão intermediária. Esses parâmetros foram determinados pela análise de três curvas de calibração e amostras de nanocápsulas a cada dia, durante três dias consecutivos. As soluções-mãe foram preparada a partir da massa exata de aproximadamente 25,0 mg de α -bisabolol diluído em 50 mL de acetonitrila. A partir da solução-mãe as curvas foram preparadas nas seguintes concentrações: 10,0 15,0 20,0, 30,0, 40,0, e 50,0 μ g/mL. As amostras de nanocápsulas foram preparadas a partir de soluções-mãe distintas daquela da curva de calibração. À estas amostras foram adicionadas quantidades de α -bisabolol resultando nas concentrações 26,0, 30,0 e 34,0 μ g/mL, sendo determinado o percentual de α -bisabolol recuperado a partir destas amostras acrescidas de substância ativa.

A média das nove curvas de calibração do α -bisabolol em acetonitrila, na faixa de concentração de 10,0 a 50,0 μ g/mL, pode ser visualizada na Figura 1. O valor de F (6,32) da ANOVA da regressão foi maior que o F tabelado (4,02) para $\alpha = 0,01$, indicando a existência de relação linear entre as variáveis relacionadas. Da mesma forma, os coeficientes de correlação (r) das curvas intra e inter-dias apresentaram valores acima de 0,99, estando de acordo com o que é preconizado pelo ICH (2005) (Tabela 1).

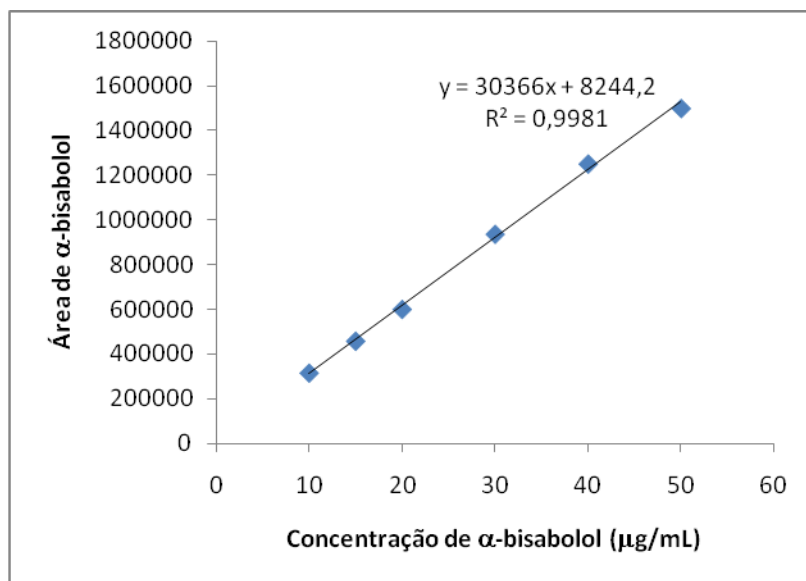


Figura 1. Média das nove curvas de calibração do α -bisabolol em acetonitrila.

Tabela 1. Coeficientes de correlação (r) das curvas de calibração do α -bisabolol.

Dia de validação	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Inter-dias
1	0,9980	0,9982	0,9979	0,9980 \pm 0,0004
2	0,9983	0,9982	0,9982	0,9982 \pm 0,0002
3	0,9982	0,9979	0,9985	0,9982 \pm 0,0003

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor adotado como verdadeiro. Foram preparadas amostras de nanocápsulas acrescidas de α -bisabolol nas concentrações de 26,0, 30,0 e 34,0 $\mu\text{g/mL}$ para avaliar esse parâmetro. Para todas as amostras o percentual de fármaco recuperado foi de 100 %, estando de acordo com os padrões estipulados pelo ICH (2005) (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento do α -bisabolol

Concentração de IndOH ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 1 Conc. \pm DP (exatidão %)	Dia 2 Conc. \pm DP (exatidão %)	Dia 3 Conc. \pm DP (exatidão %)
26,0	26,0 \pm 0,2 (100,0 %)	26,0 \pm 0,5 (100,0 %)	26,0 \pm 0,1 (100,0 %)
30,0	30,0 \pm 0,8 (100,0 %)	30,0 \pm 0,4 (100,0 %)	30,0 \pm 0,2 (100,0 %)
34,0	34,0 \pm 0,2 (100,0 %)	34,0 \pm 0,4 (100,0 %)	34,0 \pm 0,2 (100,0 %)

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade (precisão intra-dia) é a concordância dos resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes.

Os dados de repetibilidade, expressos pelos coeficientes de variação intra-dia, e os dados de precisão intermediária, expressos pelos coeficientes de variação inter-dia, foram obtidos através da análise das mesmas amostras de NC contendo α -bisabolol e apresentaram valores abaixo de 2 %.

Tabela 3. Avaliação dos coeficientes de variação intra e inter-dia do método analítico de doseamento da IndOH.

Concentração de α-bisabolol ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 1 CV %	Dia 2 CV%	Dia 3 CV%	Inter-dia CV %
22,0	1,7	1,3	1,9	1,7

Os resultados referentes aos testes de exatidão, repetibilidade e precisão intermediária e os coeficientes de correlação obtidos das curvas de calibração

apresentaram-se adequados, permitindo considerar validado o método para doseamento do α -bisabolol na faixa de concentração de 10,0 a 50,0 $\mu\text{g/mL}$.