

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

BIOQUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS  
PARA GLIOBLASTOMA ATRAVÉS DA NANOTECNOLOGIA E DA  
MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE E SISTEMA PURINÉRGICO**

**FABRÍCIO FIGUEIRÓ**

**Orientadora: Dra. Ana Maria Oliveira Battastini**

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

BIOQUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA  
GLIOBLASTOMA ATRAVÉS DA NANOTECNOLOGIA E DA MODULAÇÃO  
DO SISTEMA IMUNE E SISTEMA PURINÉRGICO**

**FABRÍCIO FIGUEIRÓ**

**Orientadora: Dra. Ana Maria Oliveira Battastini**

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFRGS –  
Bioquímica, como Requisito Parcial para Obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

PORTO ALEGRE

2015

## **Dedico**

A todos que me apoiaram nessa jornada

Em especial:

Meus pais: Dilani e Ivoni

Meus padrinhos: Gilberto e Zilá

Meus irmãos: Ana, Elisandro, Leandro e Sheila

Minha namorada: Mariana

“Inspiração existe, mas ela precisa te encontrar trabalhando.”

Pablo Picasso

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, como sempre digo, tenho o privilégio de ter quatro: a minha mãe Ivoni que com muita garra criou e constituiu uma família linda; ao meu pai Dilani que, apesar dos poucos anos de convivência, ensinou-me valores para a vida toda; aos meus padrinhos e também pais Gilberto e Zilá por todo carinho e apoio durante todos esses anos.

Aos meus irmãos Ana Carolina, Elisandro, Leandro e Sheila, por todos os momentos especiais que passamos juntos ao longo de nossa história. Por termos vencido junto todas as dificuldades.

As minhas primas/irmãs Karen, Karine e Kátia por terem aceitado dividir comigo parte de suas vidas, mesmo sem nenhuma obrigação formal. Obrigado pelo carinho.

Agradeço também a meus familiares Figueiró e Brozovitzki.

À minha namorada Mari por ser essa pessoa doce, querida, prestativa, sensata. Por podermos compartilhar tantos momentos de alegria juntos. Obrigado inclusive por entender essas inúmeras horas em que não pude lhe dar atenção!

Aos meus amigos de Ijuí, da faculdade, ou os que a vida me apresentou, que estão juntos nos momentos bons e ruins. A amizade de vocês foi e é fundamental para meu crescimento como pessoa.

À minha orientadora Ana Battastini, pelo exemplo de profissionalismo, por ter a mente aberta a novas ideias! Pela confiança e incentivo depositado que viabilizou esse companheirismo que perdura nove anos em harmonia.

À professora Sílvia Guterres e professora Adriana Pohlmann, pela disponibilidade de colaboração nesses quatro anos de doutorado.

À Vanessa pelos ensinamentos nos primeiros semestres de minha iniciação científica, aos quais foram fundamentais para minha formação.

À Andressa por tudo que representou em grande parte da minha iniciação científica, pela amizade, conselhos, ensinamentos que ajudaram a decidir minha sequência acadêmica.

À Elisa por ter me auxiliado em praticamente todo meu doutorado, por sempre estar disposta a ajudar, pela seriedade com que sempre desempenhou seu trabalho e pela amizade em todos esses anos.

Aos amigos do laboratório 22 por todo companheirismo, risadas, ensinamentos, experiências trocadas desde 2006: Andressa, Angel, Aninha, Bernardo, Carol, César, Daiane, Dani, Elisa, Eliz, Fabrícia, Felipão, Fran, Gabi, Isabele, Julia, Leti, Lila, Luci, Mari, Pati Farias, Patricia Boni, Rafa, Rudimar (emprestado) e Vanessa.

À Catiúscia, Luana e Thatiana, que foram minha conexão nos laboratórios das professoras Sílvia e Adriana, sempre dispostas a ajudar e com um sorriso no rosto.

Ao pessoal do Departamento de Bioquímica, dos mais variados laboratórios, pelas conversas, risadas, trocas de ideias e experiências compartilhadas.

A todos que colaborei nesses quatro anos de doutorado: laboratórios dos professores Adriana Pohlmann, Ângela Wyse, Christianne Salbego, Grace Gosmann, José Cláudio Moreira, Marcelo D’oca, Sílvia Guterres e Vera Lima.

À UFRGS através da Faculdade de Farmácia (graduação) e ao Departamento de Bioquímica (doutorado), por terem contribuído pela minha formação acadêmica (professores, funcionários, terceirizados, pós-graduandos e colegas).

Ao CNPq e a CAPES pelo financiamento durante esses quatro anos.

“Felicidade só é real quando compartilhada”

“Alexander Supertramp”

## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	13
INTRODUÇÃO .....	14
1. Gliomas .....	14
1.1. Glioblastoma Multiforme .....	15
1.2. Tratamento .....	17
2. Nanopartículas .....	19
2.1. Nanocápsulas .....	20
3. Resveratrol .....	21
4. Metotrexato .....	23
5. Sistema Purinérgico .....	25
5.1. Nucleotídeos e Receptores Purinérgicos .....	25
5.2. Ectonucleotidasas .....	26
6. Glioblastoma Multiforme e Sistema Purinérgico .....	28
7. Linfócitos T, Câncer e Sistema Purinérgico .....	29
8. Linfócitos B regulatórios .....	32
OBJETIVOS .....	35
CAPÍTULO I .....	36
CAPÍTULO II .....	48
CAPÍTULO III .....	60
CAPÍTULO IV .....	82
DISCUSSÃO .....	118
CONCLUSÕES .....	140
PERSPECTIVAS .....	142
REFERÊNCIAS .....	143

## RESUMO

Glioblastoma multiforme (GBM) é o mais comum e mais maligno tumor cerebral. O péssimo prognóstico é parcialmente devido à baixa biodisponibilidade dos quimioterápicos no tecido tumoral, recorrência originada por células precursoras resistentes ao tratamento e um sistema imune comprometido. De fato, linfócitos regulatórios modulam o sistema imune para uma resposta pró-tumoral, tornando ainda mais difícil o tratamento. Nesse contexto, nanocápsulas lipídicas (LNCs) têm sido amplamente estudadas a fim de aumentar especificidade dos fármacos ao tecido tumoral. Metotrexato (MTX) e *trans*-resveratrol (RSV) possuem ação antitumoral já descrita, mas necessitam doses relativamente altas para ação anti-glioblastoma *in vivo*. O MTX também possui ação imunossupressora através do aumento de adenosina no meio extracelular. A Adenosina, por sua vez, pode modular tanto células efetoras quanto células regulatórias no microambiente tumoral. Dessa forma, a hipótese apresentada nessa tese é que o RSV e o MTX possam ser mais eficazes quando carregados por nanocápsulas em modelos de GBM. Além disso, buscamos avaliar se o MTX poderia interferir com enzimas do sistema purinérgico. Por fim, pesquisamos como a adenosina poderia modular linfócitos B e T através das enzimas CD39 e ecto-5'-NT/CD73. O RSV em nanocápsulas e o MTX em nanocápsulas (RSV-LNCs e MTX-LNCs) aumentaram a atividade anti-tumoral em relação aos compostos em solução, induzindo parada no ciclo celular e apoptose em células de GBM. O MTX diminuiu a expressão da proteína antiapoptótica BCL-2 e aumentou a caspase-3 ativa, levando as células de GBM à apoptose. Além disso, o MTX aumentou a expressão da enzima ecto-5'-NT/CD73 tanto em células de glioma quanto em linfócitos T presentes no microambiente dos gliomas. Esse aumento da expressão foi acompanhado da diminuição em linfócitos T efetores e T regulatórios. Também, demonstramos que linfócitos B que possuem alta expressão da enzima CD39, tem capacidade supressiva sobre linfócitos efetores. Em conjunto, os resultados apresentados nessa Tese apresentaram possíveis novas alternativas de tratamento e contribuíram para melhor compreender esse maligno câncer cerebral.

## ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and most malignant brain tumor. The awful prognosis is in part due to the low bioavailability of chemotherapy agents in the tumoral tissue, recurrence originated from treatment-resistant progenitor cells and an impaired immune system. Indeed, regulatory lymphocytes modulate the immune system toward a pro-tumoral response, turning the treatment even more difficult. In this sense, lipid-core nanocapsules (LNCs) have been widely studied to raise the drug specificity to the tumor. Methotrexate (MTX) and *trans*-resveratrol (RSV) have antitumoral activity, but need relatively high doses to the anti-glioblastoma outcome *in vivo*. MTX has immunosuppressive capability mediated by the increase of adenosine in the extracellular milieu. Adenosine in turn may modulate both effector and regulatory immune cells in the tumoral microenvironment. Thereby, the hypothesis presented is that RSV and MTX may have an antitumor improvement when loaded into LNCs in GBM models. Moreover, we sought to evaluate whether MTX could interfere with purinergic enzymes. Lastly, we evaluated how adenosine could modulate B- and T-lymphocytes through CD39 and ecto-5'-NT enzymes. RSV- and MTX-loaded lipid-core nanocapsules (RSV-LNCs or MTX-LNCs) increased their antitumoral outcome in relation to the solution compounds, inducing both cell cycle arrest and apoptosis in GBM cells. MTX decreased the expression of the antiapoptotic protein BCL-2 and increased the active caspase-3, triggering glioblastoma cells to apoptosis. Furthermore, MTX increased the expression of ecto-5'-NT/CD73 in glioma cells and T lymphocytes of the glioma microenvironment. This up-regulation was followed by decreasing in T effector and T regulatory lymphocytes. Also, we further demonstrated that B lymphocytes with high expression of CD39 enzyme can suppress T effector lymphocytes. Taken together, the results presented herein indicate newfound treatment approaches and new knowledge regarding to this deadliest brain tumor.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADA - adenosina deaminase
- ADP - adenosina difosfato (*adenosine diphosphate*)
- AKT - proteína cinase B (*protein Kinase B*)
- ALT - alanina amino transferase
- AMP - adenosina monofosfato (*adenosine monophosphate*)
- AMPCP -  $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-diphosphate
- AST - aspartato amino transferase
- ATP - adenosina trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)
- BCL-2 - B-cell lymphoma 2
- BHE - barreira hematoencefálica
- Breg - linfócitos B regulatórios
- CD - *cluster of differentiation*
- CD73 - ecto-5'-nucleotidase/CD73
- CTL, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> - linfócitos T citotóxicos (*cytotoxic T-lymphocytes*)
- Ecto-5'-NT/CD73 - ecto-5'-nucleotidase/CD73
- E-NPPs - *ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases*
- E-NTPDase1/CD39 - *ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1*
- E-NTPDases - ecto-nucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases
- Foxp3- *forkhead box P3*
- GBM - glioblastoma multiforme
- GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
- IL-10 - interleucina-10 (*Interleukin-10*)
- IL-2 - interleucina-2 (*Interleukin-2*)
- IL-4 - interleucina-4 (*Interleukin-4*)
- IL-6 - interleucina-6 (*Interleukin-6*)
- LNCs - nanocápsulas lipídicas (*Lipid-core nanocapsules*)

MAG - microambiente dos gliomas

MTX - metotrexato

MTX-(OEt)<sub>2</sub> - diéster de metotrexato

MTX-LNCs - metotrexato em nanocápsulas lipídicas (*methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules*)

NF-κB - fator nuclear kappa-B (*Nuclear Factor-kappaB*)

NK - *natural killer cells*

OMS - Organização Mundial da Saúde

P1 - receptor purinérgico metabotrópico para adenosina, dividido em quatro subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>

P2X - receptor purinérgico ionotrópico para o ATP

P2Y - receptor purinérgico metabotrópico para nucleotídeos

p53 - gene supressor tumoral (*tumor protein p53*)

PEG - polietilenoglicol

RSV - *trans*-resveratrol

RSV-LNCs- *trans*-Resveratrol em nanocápsulas lipídicas (*trans-Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules*)

SG - sobrevivência global

SLP - sobrevivência livre de progressão

SNC - sistema nervoso central

Teff - linfócitos-T efetores (*T-effector lymphocytes*)

TGF-β – fator beta de transformação do crescimento (*Transforming growth factor beta*)

Th, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> - linfócitos T auxiliares (*T helper lymphocytes*)

TNF-α- fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

Treg, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/FOXP3<sup>+</sup> - linfócitos T regulatórios

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

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação de mutações capazes do originar progenitores tumorais e consequentemente glioblastoma.....	17
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo da vetorização de fármacos por nanopartículas à área tumoral.....	21
<b>Figura 3.</b> Representação dos multimecanismos celulares que o resveratrol pode modular.....	23
<b>Figura 4.</b> Estrutura e mecanismo de ação clássico do Metotrexato.....	24
<b>Figure 5.</b> Esquema simplificado dos receptores purinérgicos e da hidrólise de nucleotídeos no meio extracelular pelas ectonucleotidasas.....	28
<b>Figura 6.</b> Efeito coordenado da produção de adenosina por células de glioma CD73 <sup>+</sup> e linfócitos T regulatórios CD39 <sup>+</sup> .....	31
<b>Figura 7.</b> Diferentes células que linfócitos B regulatórios podem modular através de citocinas secretadas.....	34

# INTRODUÇÃO

## 1. Gliomas

Gliomas são os tumores primários mais comuns e devastadores do sistema nervoso central (SNC) em adultos, correspondendo a cerca de 80% de todos os tumores desse sistema (Sathornsumetee et al. 2007). Gliomas foram primeiramente descritos por Virchow (1863/1865) como um enorme tumor cerebral, normalmente com lenta evolução clínica e sem delimitação em relação ao tecido não tumoral (Scherer 1940). Após essa descrição, que incluiu pela primeira vez uma análise histopatológica, os gliomas vêm sendo amplamente estudados, apesar de, infelizmente, ainda não haver intervenção terapêutica satisfatória para os graus mais invasivos. De forma geral, gliomas são mais comuns em adultos com idade superior a 40 anos, sendo que, homens caucasianos são mais frequentemente acometidos (Ostrom et al. 2014, Preusser et al. 2006). Em estudo analisado entre 2005 e 2009 nos Estados Unidos, gliomas apresentaram incidência anual de 5,26 para cada 100.000 habitantes (Dolecek et al. 2012).

Historicamente, os gliomas foram classificados pela neuro-oncologia tradicional através da semelhança morfológica em relação as células gliais, sugerindo que os astrocitomas, por exemplo, tenham uma origem astrocítica ou sejam derivados de um precursor astrocítico imediato. Nesse sentido, gliomas são classificados pela organização mundial da saúde (OMS) em astrocitomas (grau I a IV), oligodendrogliomas (grau II e III) e oligoastrocitoma (grau II e III). Especificamente, a OMS classifica os gliomas astrocíticos em quatro graus de malignidade:

- Grau I, astrocitoma pilocítico, que acometem principalmente crianças com idade entre 5 a 15 anos, apresentando baixa capacidade invasiva e sendo facilmente

removidos por ressecção cirúrgica;

- Grau II, astrocitoma de baixo grau, crescem de forma relativamente lenta, podendo ou não invadir o tecido cerebral normal adjacente;

- Grau III, astrocitoma anaplástico, podem ser tumores recorrentes de neoplasias de baixo grau, apresentam uma taxa de crescimento maior que os anteriores e invadem o tecido adjacente normal. Após o tratamento, a recorrência desse tumor é elevada;

- Grau IV, glioblastoma multiforme, maior grau de malignidade e altamente invasivo. Pacientes apresentam um péssimo prognóstico, com sobrevida inferior a um ano, sendo que essa estatística não se modificou significativamente nas últimas duas décadas.

Por outro lado, atualmente, vem crescendo o conhecimento da derivação neoplásica através de células precursoras menos diferenciadas como, por exemplo, as células tronco neurais e/ou tumorais, que possuem um poder maior de diferenciação e, conseqüentemente, maior incidência a eventos mutacionais que podem levar à formação de neoplasias multifatoriais (Louis et al. 2001, Van Meir et al. 2010).

### **1.1. Glioblastoma Multiforme**

Os glioblastomas multiformes (GBM) são divididos em dois subtipos: GBM primários, que ocorrem em pacientes com idade superior a 50 anos e GBM secundários, que ocorrem em pacientes jovens e são provenientes de gliomas de menor grau de malignidade, sendo que os dois tipos de GBM apresentam diferenças moleculares, mas são morfologicamente indistinguíveis (Watanabe et al. 1996). Os GBM vêm sendo diagnosticado com pelo menos três das características como atipia nuclear, mitose, proliferação vascular e necrose. A baixa sobrevida dos pacientes com esse tipo de tumor

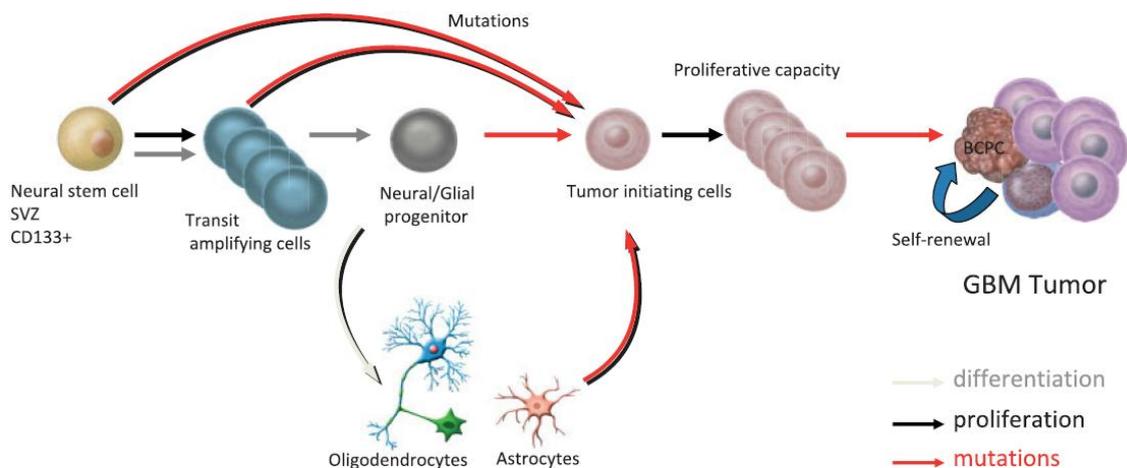
altamente invasivo está relacionada, principalmente, a alta taxa de recorrência, ainda inevitável pelas terapias convencionais (Louis et al. 2007).

Recentemente, tem sido descrita a origem de células com características de GBM não apenas a partir de células já diferenciadas, como astrócitos e oligodendrócitos, mas também a partir de células tronco neurais (Figura 1) (Van Meir et al. 2010). Células progenitoras podem ser um intermediário da formação de células neoplásicas através da formação de células tronco tumorais que são inerentemente resistentes a fármacos quimioterápicos e à radioterapia. Portanto, essas células tronco tumorais podem, não apenas iniciar uma nova neoplasia, como ser a principal causa de recorrência desses tumores e consequente falha da quimio/radioterapia (Pointer et al. 2014).

A heterogeneidade celular e molecular aliada à invasividade ao tecido não tumoral adjacente fazem desses tumores um grande desafio a ser vencido pela ciência. A análise histopatológica desses tumores evidencia focos de necrose, neovascularização, núcleos mitóticos, além de grande infiltrado inflamatório (Konopka and Bonni 2003, Lacroix et al. 2001, Wen and Kesari 2008).

Os agentes quimioterápicos disponíveis demonstram eficácia limitada. A primeira razão para isto é devido à presença da barreira hematoencefálica, que limita a entrada dos quimioterápicos no SNC, de modo que apenas fármacos lipofílicos podem ser utilizados (van Tellingen et al. 2015). Além dessa barreira fisiológica imposta aos fármacos, existem mecanismos de resistência a multidrogas como, por exemplo, a ação da glicoproteína-P que reduz a passagem de fármacos pelas células endoteliais que compõe a barreira hematoencefálica (BHE) e também diminui o acúmulo de fármacos dentro das células tumorais pelo efluxo para o meio extracelular, com consequente diminuição da eficácia terapêutica (Szakacs et al. 2006). Outro motivo para a falha terapêutica é devido à grande heterogeneidade celular: esses tumores são compostos

principalmente por células neoplásicas em proliferação e muitas células do sistema imune que estão moduladas para um fenótipo pró-tumoral, o que faz com que os fármacos se tornem ineficazes em sobrepujar esse complexo sistema proliferativo desenvolvido pelos tumores (Nieto-Sampedro et al. 2011, Wen and Kesari 2008).



**Figura 1. Representação de mutações capazes de originar progenitores tumorais e consequentemente glioblastoma (Van Meir et al. 2010). SVZ (subventricular zone)**

## 1.2. Tratamento

Para o tratamento do GMB, apesar de intensos esforços em desenvolver novas terapias, agentes efetivos ainda não estão disponíveis. A ressecção cirúrgica representa o tratamento de primeira escolha para os pacientes com GBM, entretanto a retirada completa do tumor é limitada pela alta invasividade das células tumorais no tecido normal circundante, o que leva a uma elevada taxa de recorrência (Behin et al. 2003). Assim, a maioria dos pacientes é tratada com radioterapia e/ou quimioterapia pós-

operatória (Mazeron and Kantor 1998).

O fármaco de escolha para tratamento dos GBM é a temozolomida (Temodal®), agente alquilante do DNA com administração oral e lipofilicidade suficiente para atingir o SNC. Em estudo clínico de fase III, 573 pacientes foram separados randomicamente quanto a receber ou não temozolomida como adjuvante à radioterapia. Brevemente, a sobrevida média dos pacientes passou de 12,1 meses, para pacientes tratados somente com radioterapia, para 14,6 meses, para pacientes tratados com radioterapia mais temozolomida (Stupp et al. 2005), demonstrando um discreto aumento na sobrevida dos pacientes e a necessidade por intervenções mais significativas.

Com base nesse aumento discreto referente à quimioterapia convencional, alternativas vem sendo estudadas, como, por exemplo, a separação de pacientes a grupos genéticos específicos. Nesse sentido, foi demonstrado que há maior sensibilidade à temozolomida em pacientes com metilação na região promotora do gene O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase, fazendo com que a taxa de sobrevida de 5 anos aumentasse de 5% para 14% (Hegi et al. 2005). Alternativas também têm sido estudadas quanto à posologia da temozolomida, a fim de aumentar a sobrevida dos pacientes diagnosticados com GBM, entretanto os aumentos de sobrevida global (SG) e/ou sobrevida livre de progressão (SLP) são muito discretos em relação à sobrevida média de 14 meses do programa posológico padrão (Gilbert et al. 2013).

Os GBM estão entre os tumores mais vascularizados, com isso, compostos que inibam a angiogênese podem ser alternativas interessantes para o tratamento desses tumores. Nesse sentido, bevacizumab, um anticorpo monoclonal humanizado que inibe VEGF, vem sendo estudado em ensaio clínico de fase III. Embora o bevacizumab aumente ligeiramente a SLP não reduz a SG dos pacientes tratados com temozolomida/radioterapia com acréscimo de bevacizumab em relação ao placebo

(Chinot et al. 2014, Gilbert et al. 2014).

Em suma, os GBM levam a um péssimo prognóstico para os pacientes, sem avanços significativos da terapêutica nas últimas décadas e com consideráveis efeitos adversos da quimio-radioterapia. Portanto, é necessário um melhor entendimento da patologia desses tumores, bem como desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam reverter esse quadro.

## **2. Nanopartículas**

A baixa especificidade dos quimioterápicos à região tumoral leva ao insucesso do tratamento e agravamento dos efeitos adversos. Assim, o acoplamento entre fármacos potentes e sistemas que direcionem e controlem a liberação desses compostos para aumentar a eficácia terapêutica são necessários. Nesse sentido, carreadores coloidais de fármacos, incluindo nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos, apresentam-se como veículos promissores para administração de fármacos em diferentes vias, possibilitando a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias com conseqüente diminuição dos efeitos adversos (Alvarez-Roman et al. 2001, Couvreur and Vauthier 2006).

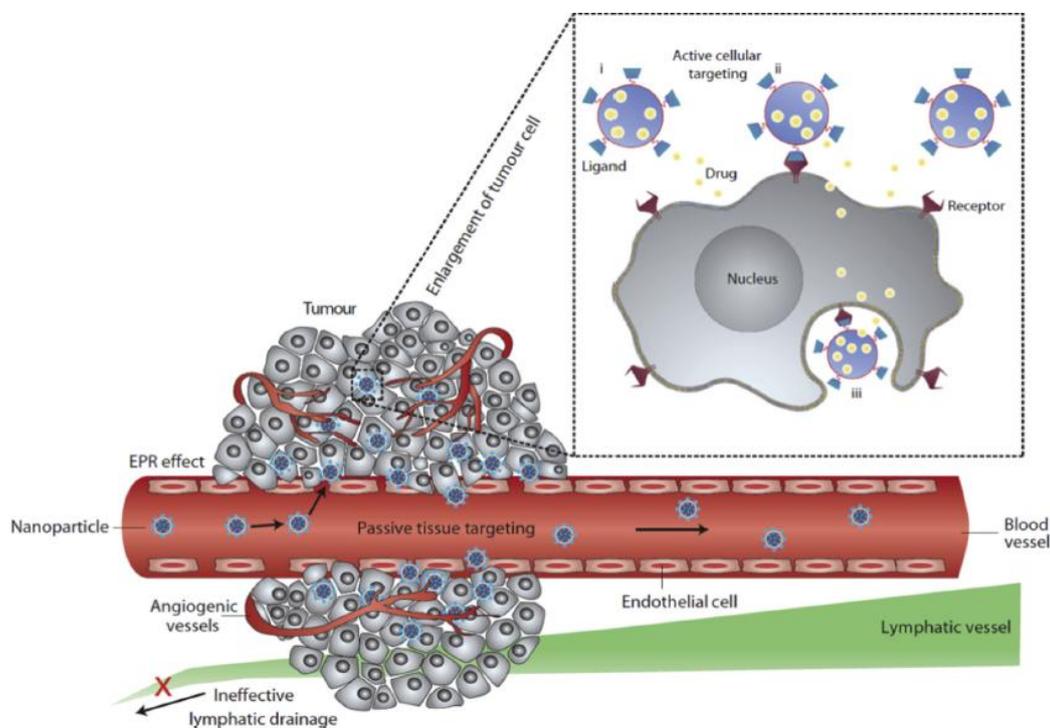
Sistemas nanométricos podem melhorar a resposta terapêutica através da vetorização a órgãos, tecidos ou células específicas com possível diminuição de dose e número de administrações, com aumento da concentração de fármaco na região tumoral, acarretando em maior resposta terapêutica, menores efeitos adversos e maior adesão ao tratamento (Perez-Herrero and Fernandez-Medarde 2015). Sistemas de liberação de fármacos já estão disponíveis clinicamente. Entre esses, destacam-se os lipossomas, amplamente estudados para tratamento do câncer. Lipossomas contendo doxorubicina

são os mais utilizados, tendo sido o primeiro carreador aprovado para comercialização em 1995 para tratamento de sarcoma de Kaposi (Doxil<sup>®</sup>) (Slingerland et al. 2012).

## **2.1.Nanocápsulas**

Nanocápsulas poliméricas foram primeiramente descritas na década de 70. As nanocápsulas, também consideradas um sistema "reservatório", são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica, dependendo das propriedades físico-químicas e da composição das nanocápsulas (Couvreur et al. 2002). Nanocápsulas são largamente estudadas como alternativa promissora em aumentar a resposta antitumoral dos quimioterápicos, principalmente por aumentar a concentração de fármaco na região tumoral, uma vez que uma única nanocápsula pode carrear muitas moléculas de fármaco (Maeda et al. 2013, Poletto et al. 2012). O uso de nanocápsulas na terapia de tumores sólidos também se mostra promissor devido à maior permeabilidade capilar desses sistemas nanoestruturados, através da maior transposição à barreira hematoencefálica e superação à ação do efluxo da glicoproteína-P, bem como ao aumento da retenção na área tumoral, o que pode levar a uma liberação sustentada do fármaco no combate às células do tumor (Brigger et al. 2002, Garcia-Garcia et al. 2005, Vinogradov et al. 2002). Nanocápsulas podem ser administradas por diferentes vias e são estáveis, inclusive, quando administradas por via oral (Frezza et al. 2010). Resumidamente, nanocápsulas poliméricas lipídicas tem sido descritas por sobrepujar mecanismos de resistência no tratamento do câncer, como diminuição da captação por células do sistema imune; aumento da transposição à BHE; invisibilidade a proteínas que compõe o efluxo de fármacos da resistência a multidroga; aumento na retenção em

um sistema linfático comprometido, resultando em maior biodisponibilidade no microambiente, com conseqüente maior captação pelas células neoplásicas e aumento da atividade antitumoral (Figura 2) (Frank et al. 2015, Pohlmann et al. 2013).



**Figura 2. Esquema representativo da vetorização de fármacos por nanopartículas à área tumoral (Perez-Herrero and Fernandez-Medarde 2015).**

### 3. Resveratrol

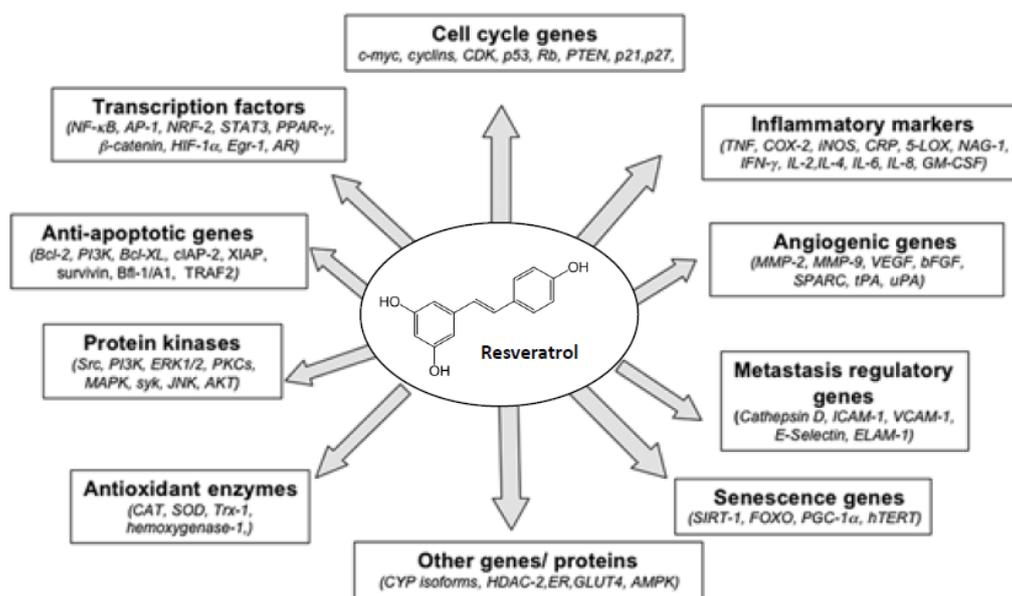
O resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol natural abundantemente encontrado em ervas e alimentos como uva, amendoim e bagas. É sintetizado em plantas em resposta a injúria, radiação ultravioleta ou ataque de fungos. Apesar de naturalmente existir na forma de isômeros *cis* e *trans*, o resveratrol é comercialmente encontrado em sua forma *trans*, a qual tem sido amplamente estudada. Esse promissor fitoquímico possui diversas atividades, em que se destacam a ação antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetor e antitumoral (Kundu and Surh 2008,

Novelle et al. 2015). A atividade antitumoral foi primeiramente descrita por Pezzuto e colaboradores em 1997 que mostraram a capacidade do resveratrol em inibir as três maiores etapas da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão tumoral (Jang and Pezzuto 1999, Jang et al. 1997). O resveratrol pode induzir diferentes processos às células tumorais, tais como parada no ciclo celular, diferenciação e apoptose através da modulação de fatores de transcrição sabidamente envolvidos na progressão do câncer, como o NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappaB (*nuclear factor-kappaB*)) e modulação de supressores tumorais, como a proteína p53 (Figura 3) (Singh et al. 2015, Whitlock and Baek 2012).

Além de amplamente estudado como citotóxico a diversos tipos de células tumorais, o resveratrol também tem sido visto como um quimiosensibilizador às células cancerígenas, aumentando a resposta de quimioterápicos convencionais por alterar sistemas como transportadores de fármacos, proteínas de sobrevivência, proliferação celular e mecanismos como a via do NF- $\kappa$ B (Gupta et al. 2011). Alguns trabalhos têm demonstrado o potencial efeito citotóxico do resveratrol em modelos pré-clínicos de glioma (Gagliano et al. 2010) e também a capacidade de sensibilizar células de GBM à temozolomida (Nakada et al. 2012).

Grande parte dos estudos demonstra a atividade *in vitro* do resveratrol frente a tumores, uma vez que *in vivo* o resveratrol sofre rápida metabolização o que pode levar à ineficácia no tratamento pela inatividade antitumoral dos seus metabólitos (Zunino and Storms 2015). A rápida metabolização do resveratrol foi inclusive demonstrada em estudo clínico, sendo consistente com os estudos pré-clínicos que demonstravam baixa biodisponibilidade desse polifenol (Brown et al. 2010). Portanto, alternativas, como a nanotecnologia, que diminuam a rápida metabolização desse composto aliado ao aumento da biodisponibilidade sítio específico em tumores sólidos estão sendo

desenvolvidas para transcender a atividade *in vitro* à atividade antitumoral *in vivo* (Jose et al. 2014, Jung et al. 2014).

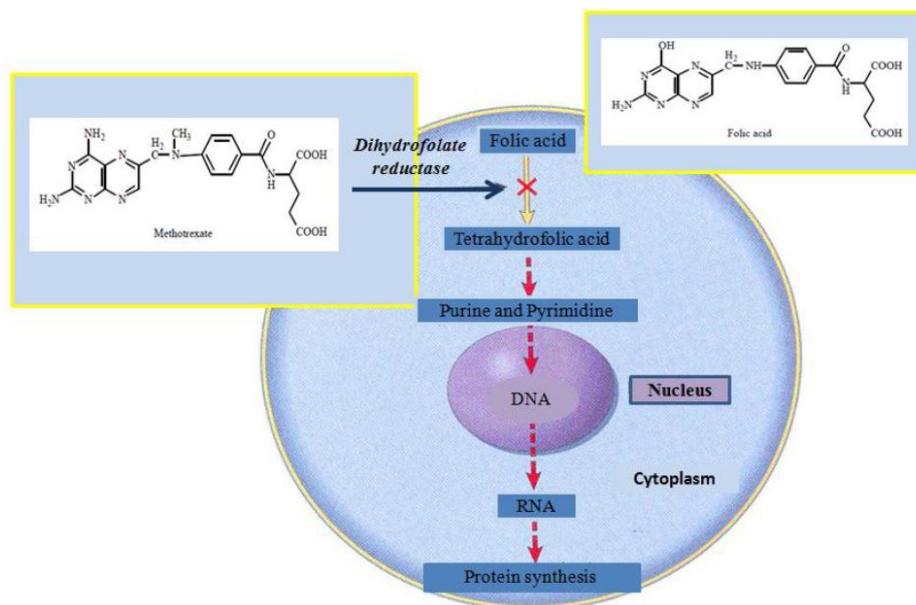


**Figura 3. Representação dos multimecanismos celulares que o resveratrol pode modular** (Harikumar and Aggarwal 2008).

#### 4. Metotrexato

O metotrexato (MTX, *4-amino-4-deoxy-N10-methyl pteroylglutamic acid*), quimioterápico convencional amplamente utilizado na clínica desde a década de 40 para tratamento da leucemia linfocítica aguda, é um antimetabólito, estruturalmente análogo ao ácido fólico. O MTX inibe de maneira competitiva a atividade da enzima diidrofolato redutase, resultando na depleção de tetrahidrofolato, necessário para a síntese de purinas e timidilato (Figura 4), importante para a fase de síntese de DNA do ciclo celular (fase S) (McGuire et al. 2003). Sua ação é mais marcante sobre populações celulares em fase de crescimento exponencial, o que explica sua maior atividade sobre células tumorais e ação sobre tecidos em proliferação como sistema imune (Huennekens

1994). Como os receptores do folato são altamente expressos na membrana de muitos tipos de células tumorais, o metotrexato tem sido um fármaco estudado e empregado como adjuvante e/ou no tratamento de diversos tipos de câncer como de cérebro, mama, ovário e muitas leucemias, bem como contra condições não neoplásicas, como imunossupressor na psoríase grave e doenças reumáticas (Grim et al. 2003, McGuire 2003).



**Figura 4. Estrutura e mecanismo de ação clássico do Metotrexato (McGuire 2003).**

Em estudos farmacocinéticos e terapêuticos para neoplasias do sistema nervoso central, verificou-se que uma biodisponibilidade capaz de causar atividade antitumoral satisfatória necessita de altas doses ou infusão contínua de MTX, o que pode levar a toxicidade e abandono de tratamento (Chan and Rajakumar 2014, Dukic et al. 1999). O MTX foi utilizado em ensaio clínico como tratamento prévio à quimio-radioterapia em pacientes com glioma de alto grau, os resultados mostraram que o tratamento prévio com altas doses de MTX aumenta da SLR e a SG, embora o último não tenha atingido significância estatística (Wolff et al. 2011).

O MTX tem sido estudado em ensaios pré-clínicos e clínicos para glioma, ao qual aliado a estudos de farmacocinética demonstram que somente uma pequena parcela de fármaco atinge o SNC, necessitando, por isso, de altas doses, o que pode levar a efeitos adversos indesejados (Dukic et al. 1999). Dessa forma, sistemas carreadores estão sendo desenvolvidos para aumentar a biodisponibilidade desse quimioterápico na área tumoral e diminuir a dose de MTX necessária para a citotoxicidade específica às células malignas (Abolmaali et al. 2013).

Além do mecanismo de ação clássico que envolve a inibição da síntese de DNA, foi descrito que o MTX, por aumentar a concentração de adenosina no meio extracelular, pode, pelo menos em parte, ser responsável pela resposta anti-inflamatória e imunossupressora desse fármaco (Montesinos et al. 2007, Morabito et al. 1998), através principalmente da ligação da adenosina aos receptores  $A_{2A}R$  e  $A_3R$  (Montesinos et al. 2003).

## **5. Sistema Purinérgico**

### **5.1. Nucleotídeos e Receptores Purinérgicos**

O ATP (adenosina trifosfato) e outros nucleotídeos e nucleosídeos são encontrados em todos os sistemas orgânicos e produzem efeitos biológicos tanto no meio intracelular como no meio extracelular (Illes et al. 2000, Yegutkin 2008). Assim, o ATP intracelular serve como molécula energética para processos como transporte ativo, mobilidade celular e biossíntese, enquanto que o ATP extracelular é uma potente molécula sinalizadora (Yegutkin 2008). Os nucleotídeos, em especial o ATP, atuam na neurotransmissão, neuromodulação, resposta imune, controle do tráfego de leucócitos do sangue para os tecidos, agregação plaquetária e dor, entre outras funções (Burnstock

2004). Por outro lado, a adenosina, um nucleosídeo produto da degradação do ATP extracelular, pode ser considerada uma molécula sinalizadora de dano celular, exercendo em geral ações contrárias as do ATP (Bours et al. 2006, Frantz et al. 2005). Assim, por exemplo, a adenosina, através de uma resposta imunossupressora, protege os tecidos adjacentes à inflamação dos ataques promovidos pelas células de defesa (Sitkovsky and Ohta 2005).

Todos os efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeos ocorrem através da ligação a seus receptores específicos, os purinoreceptores, os quais são divididos em receptores do tipo P1 e P2 (Illes et al. 2000). Os receptores de adenosina (P1) são subdivididos em  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$  e todos estão acoplados às proteínas G. Já os receptores P2 são subdivididos em P2X e P2Y. Os receptores ionotrópicos específicos para o ATP (P2X) estão ligados a canais iônicos ( $Na^+/K^+/Ca^{2+}$ ) e até o momento foram clonados e caracterizados sete membros: P2X<sub>1</sub> até P2X<sub>7</sub> (Abbracchio and Burnstock 1994). Os receptores P2Y (metabotrópicos), assim como os receptores P1, também são acoplados às proteínas G sendo sub-divididos em P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>, são sensíveis as purinas e pirimidinas di- e trifosfatadas (White and Burnstock 2006).

## **5.2. Ectonucleotidases**

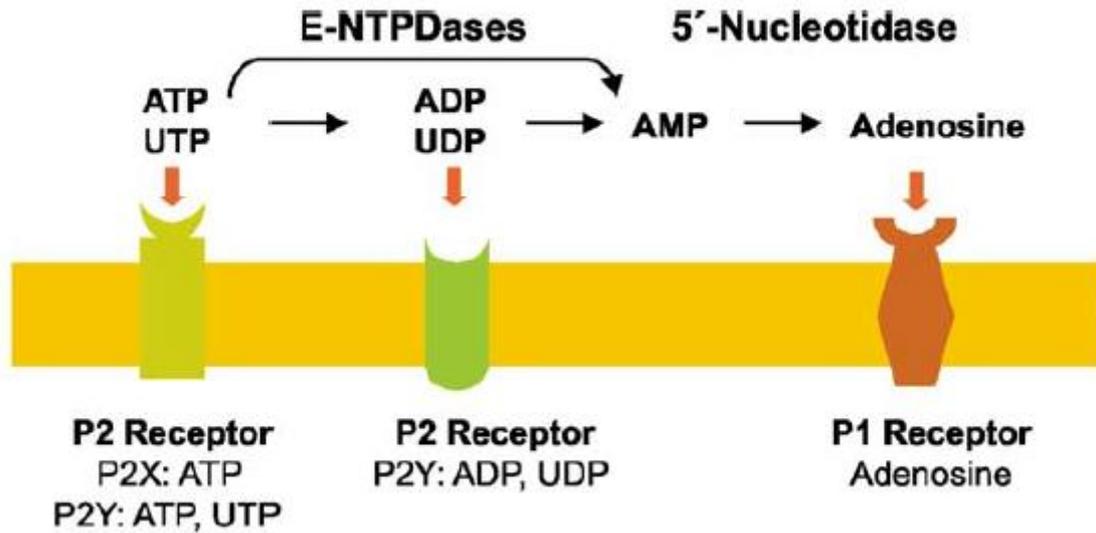
Os nucleotídeos liberados para o meio extracelular são hidrolisados até seus nucleosídeos correspondentes pela ação catalítica das ectonucleotidases (Yegutkin 2008), as quais são enzimas associadas à membrana plasmática com o sítio ativo voltado para o meio extracelular ou associadas às membranas intracelulares com o sítio ativo voltado para o lúmen de organelas. A família das ectonucleotidases é constituída pelas E-NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases), E-NPPs (ecto-

nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases), fosfatase alcalina e ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Zimmermann 2000). As ectonucleotidasas, coletivamente pertencem à família de proteínas de superfície celular relacionadas à CD39, um antígeno de ativação linfóide (Knowles 2011).

As E-NTPDases hidrolisam nucleosídeos tri e di fosfatados até seus respectivos nucleosídeos monofosfatados e sua atividade catalítica é dependente de cátions divalentes tais como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (Lavoie et al. 2004, Vorhoff et al. 2005). Até o momento, oito membros dessa família de enzimas foram identificados, E-NTPDases 1-8 (Zimmermann, 2001; Robson et al. 2006, Robson et al. 2005). As E-NTPDases identificadas até então, pertencem à família da CD39, sendo a ENTPDase1 também identificada como CD39 (ENTPDase1/CD39). Essas enzimas hidrolisam uma variedade de nucleosídeos di e tri fosfatados e a preferência pelo substrato é diferente para cada uma delas. As E-NTPDases 1, 2, 3 e 8 possuem uma razão de hidrólise ATP/ADP de aproximadamente 1:1; 30:1; 3:1; 2:1, respectivamente (Zimmermann 2000). Recentemente, as E-NTPDases foram identificadas como membros da “GDA1\_CD39 superfamily” (Knowles 2011).

A etapa final de transformação do ATP em adenosina é catalisada pela ecto-5'-nucleotidase identificada como CD73 (ecto-5'-NT/CD73). Essa enzima é a principal formadora de adenosina a partir de AMP (adenosina monofosfato) no meio extracelular de forma irreversível, portanto o controle da sua atividade enzimática é essencial para a manutenção de níveis adequados deste nucleosídeo e, conseqüentemente, dos efeitos mediados via receptores P1 (Beavis et al. 2012, Zimmermann 2000). Entretanto, essa enzima não regula apenas a cascata de sinalização purinérgica, mas também está envolvida em mecanismos que vão além da atividade enzimática, como adesão entre células e adesão entre células e a matriz extracelular, bem como em mecanismos que

levam a migração celular (Cappellari et al. 2012, Zhou et al. 2007).



**Figure 5. Esquema simplificado dos receptores purinérgicos e da hidrólise de nucleotídeos no meio extracelular pelas ectonucleotidases (Robson et al. 2006).**

## 6. Glioblastoma Multiforme e Sistema Purinérgico

Estudos prévios do nosso laboratório verificaram que células de linhagem de glioma apresentam um comportamento, relativo à hidrólise dos nucleotídeos extracelulares, oposto ao observado nos astrócitos, uma vez que as células de glioma apresentam uma baixa atividade ATPásica e uma alta atividade AMPásica (Wink et al. 2003). Esse comportamento parece favorecer o acúmulo de ATP, que leva à morte do tecido adjacente normal e induz proliferação celular em diferentes linhagens de glioma, além de aumentar a concentração de adenosina, a qual induz angiogênese e imunossupressão (Bavaresco et al. 2008, Morrone et al. 2005, Wink et al. 2003). Em experimentos utilizando o modelo de implante de glioma *in vivo* em cérebro de ratos, verificou-se que o implante de células tumorais com apirase, uma enzima *scavenger* de ATP e ADP com

características cinéticas similares a ENTPDase1/CD39, resultou em diminuição do volume tumoral a qual foi acompanhada de decréscimo de infiltrado inflamatório e de angiogênese (Morrone et al. 2006). Por outro lado, também se observou que a restauração da atividade da ENTPDase2/CD39L1, a NTPDase majoritária em astrócitos, pela superexpressão dessa enzima em células de glioma, surpreendentemente aumentou o volume e a malignidade dos gliomas implantados no cérebro de ratos, bem como produziu uma significativa resposta inflamatória periférica e alterações patológicas nos pulmões dos animais (Braganhof et al. 2012). Além disso, a inibição da enzima ecto-5'-NT/CD73 tem sido amplamente demonstrada como mecanismo mediador de ação antitumoral (para uma completa revisão ver Corbelini et al. 2015), embora estudos também demonstrem que concentrações supra-fisiológicas de adenosina possam desencadear morte em células de glioma, principalmente via receptor A<sub>3</sub> de adenosina (Bavaresco et al. 2007, Bernardi et al. 2007). Esses últimos resultados, distintos de outros trabalhos da literatura, revelam que a interação gliomas/purinas é altamente complexa e que o metabolismo diferencial de nucleotídeos extracelulares pode modular quali/quantitativamente a ativação dos receptores P1 e P2 e, dessa forma, desencadear efeitos totalmente contexto-dependente.

## **7. Linfócitos T, Câncer e Sistema Purinérgico**

Diversos tipos de câncer têm origem em sítios de infecção ou de inflamação (Balkwill and Coussens 2004). A massa tumoral é extremamente heterogênea, composta por muitas células neoplásicas em proliferação, células endoteliais e células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos (Balkwill and Coussens 2004, Solinas et al. 2009). Em gliomas, a presença de infiltrado inflamatório está diretamente correlacionada com

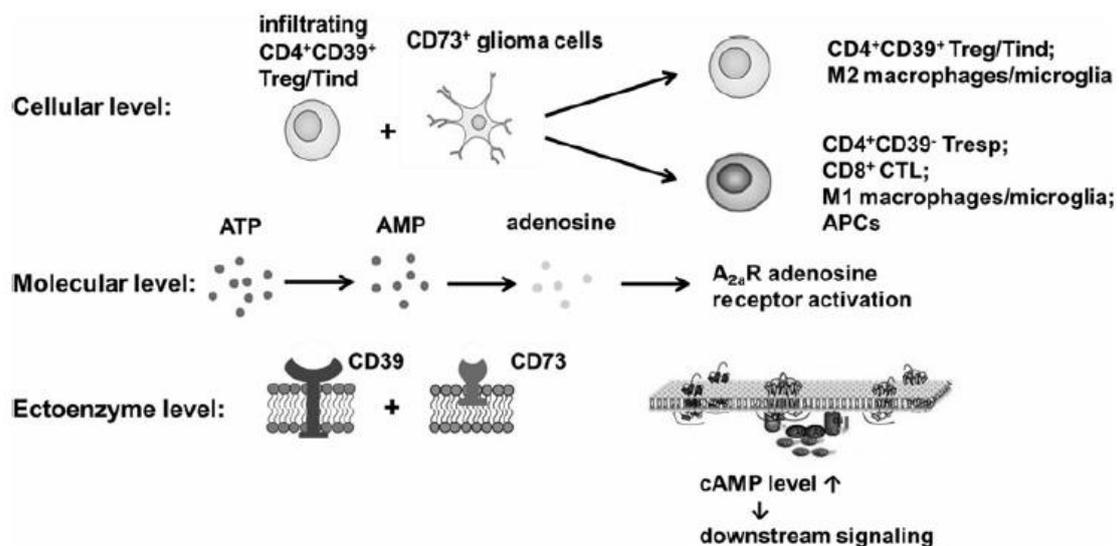
o grau de malignidade do tumor, e evidências sugerem que a presença de leucócitos no microambiente tumoral é componente indispensável nos processos de proliferação, migração e sobrevivência celular (Watters et al. 2005). A proliferação tumoral é dependente de uma rede complexa de fatores, entre eles citocinas, quimiocinas e nucleosídeos, que culminam em imunossupressão no microambiente tumoral orquestrada por, entre outras células, linfócitos T regulatórios, as quais estão diretamente correlacionadas com pior prognóstico em pacientes com glioblastoma (Sayour et al. 2015).

Os linfócitos têm papel central tanto na resposta imune celular quanto humoral. São divididos em duas grandes subclasses: células B e células T, que expressam receptores antígenos-específicos e que atuam como marcadores da imunidade adaptativa (Bours et al. 2006). Os linfócitos T são subdivididos principalmente em linfócitos T auxiliares (Th,  $CD3^+CD4^+$ ), linfócitos T citotóxicos (CTL,  $CD3^+CD8^+$ ) e linfócitos T regulatórios (Treg,  $CD4^+/CD25^{high}/FOXP3^+$ ). Estudos sugerem que a modulação da inflamação pelo sistema de sinalização purinérgica é componente determinante entre os efeitos pró-tumoral/anti-inflamatório e antitumoral/pró-inflamatório e torna esses sistemas de sinalização um interessante alvo de estudo (Sica and Bronte 2007, Solinas et al. 2009).

Os Linfócitos Treg controlam a renovação celular no timo, regulando a expansão linfocítica, inflamação crônica e processos autoimunes. Entretanto em certas condições, como no câncer, células Treg podem ser prejudiciais no combate à doença, contribuindo para um ambiente imunossuprimido, por inibir a ativação de linfócitos T efetores (Teff) e células NK (“Natural Killer”), podendo favorecer o desenvolvimento neoplásico (Bastid et al. 2012, Borsellino et al. 2007). Nesse sentido, tem sido demonstrado uma correlação entre o aumento de células Treg em sangue periférico de pacientes com piora no quadro de malignidades epiteliais (Wolf et al. 2003), carcinoma (Griffiths et al.

2007), câncer colorretal (Beyer et al. 2012) e glioblastoma multiforme (Sayour et al. 2015).

O controle da hidrólise dos nucleotídeos pela E-NTPDase1/CD39 e pela ecto-5'-NT/CD73 (E-NTPDase1/CD39 hidrolisa ATP e ADP à AMP, já a ecto-5'-NT/CD73 hidrolisa AMP à adenosina) está estritamente envolvido na imunomodulação através, dentre outras células, de linfócitos T regulatórios (Treg) em pacientes com glioma (Albesiano et al. 2010). Interessantemente, a E-NTPDase1/CD39 está superexpressa na superfície de linfócitos Treg, sendo um importante componente da maquinaria imunossupressiva (para uma completa revisão ver Burnstock and Boeynaems 2014). Essa superexpressão aumenta a produção de AMP que é o principal substrato para a enzima ecto-5'-NT/CD73, que por sua vez está superexpressa na superfície das células de glioma. Assim, essas duas enzimas estariam trabalhando de forma cooperativa para a geração de adenosina, molécula que modula a produção de citocinas e inibe a proliferação de células imunes efectoras, culminando em imunossupressão e crescimento tumoral (Xu et al. 2013).



**Figura 6.** Efeito coordenado da produção de adenosina por células de glioma CD73<sup>+</sup>, e linfócitos T regulatórios CD39<sup>+</sup> (Xu et al. 2013).

Tais habilidades tornam a ecto-5'-NT/CD73 e a E-NTPDase1/CD39 alvos interessantes de investigação e de intervenção farmacológica (Bastid et al. 2015). A superexpressão da enzima CD39 presente nos linfócitos Treg não apenas colabora para a produção de adenosina, mas para a diminuição do ATP extracelular, diminuindo os efeitos mediados por esse nucleotídeo, como, por exemplo, toxicidade celular via receptores P2 e diferenciação de células dendríticas (Borsellino et al. 2007).

Resumidamente, linfócitos Treg sofrem migração para o microambiente dos gliomas, não apenas por quimiocinas secretadas por células do sistema imune, mas pelas próprias células tumorais (Jordan et al. 2008). Uma vez no microambiente tumoral, Tregs, que superexpressam a enzima CD39, coordenadamente com células de glioma, que superexpressam CD73, produzem adenosina pela hidrólise sequencial de ATP. A adenosina, por sua vez, é capaz de suprimir células imunes efetoras, como linfócitos citotóxicos e células NK, favorecendo um ambiente pró-tumoral (Xu et al. 2013). Por outro lado, e de forma aparentemente contraditória, alguns estudos demonstram que a presença de ecto-5'-NT/CD73 na região tumoral está diretamente associada a um melhor prognóstico dos pacientes e redução de linfócitos T regulatórios no microambiente tumoral (Oh et al. 2012, Supernat et al. 2012), sugerindo, novamente, que a interação entre os sistemas purinérgico e imune no contexto neoplásico é complexa e ainda parcialmente entendida.

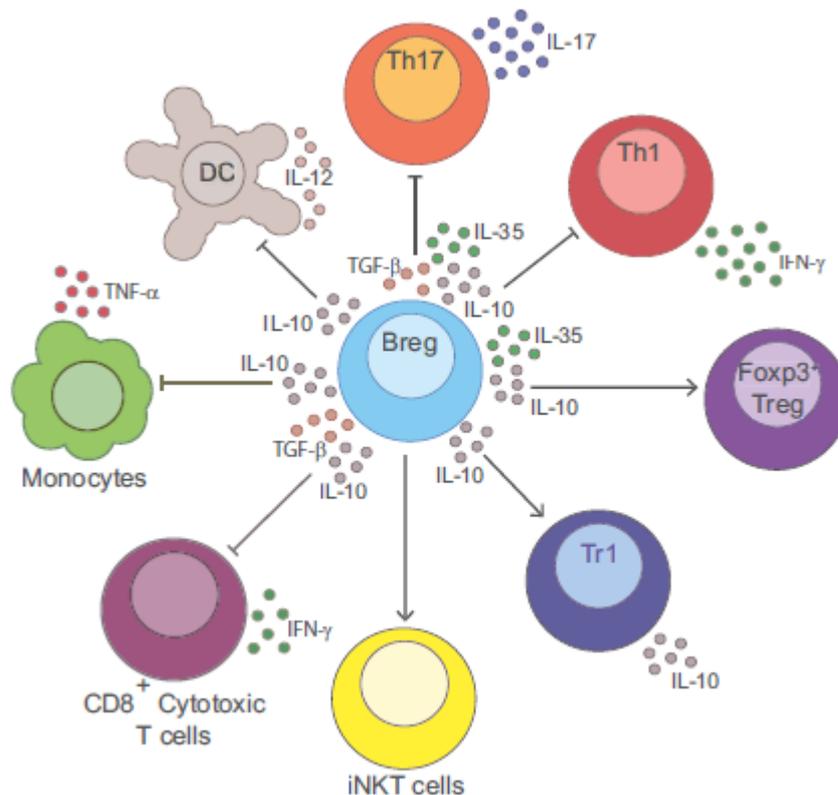
## **8. Linfócitos B regulatórios**

Os linfócitos B foram historicamente descritos por aumentar a resposta imune, principalmente pela formação de anticorpos que orquestram as defesas imunológicas. Entretanto, tem sido demonstrada a capacidade de linfócitos B em suprimir células

imunes, sugerindo-se então a denominação linfócitos B regulatórios (Bregs) (Rosser and Mauri 2015). Consequentemente, hoje se sabe que linfócitos B podem ser diferenciados de acordo com os sinais recebidos, gerando assim resposta anti- ou pró-inflamatória.

A capacidade supressiva dos linfócitos B foi primeiramente observada em um modelo pré-clínico de hipersensibilidade na década de 70 (Katz et al. 1974). Após essa descrição inicial, linfócitos Bregs somente foram mais bem estudados no início do século XXI. Em humanos, linfócitos B foram descritos por secretar IL-10, uma interleucina com capacidade supressiva sobre o sistema imune (Amu et al. 2007). Entretanto, a classificação fenotípica varia entre espécies e a correlação entre as diferentes subclasses de Bregs descritas ainda não está compreendida. A maioria dos estudos classifica Bregs de camundongo com capacidade supressiva (linfócitos B10) com os seguintes marcadores  $CD19^+CD1d^{high}CD5^+$  (Rincon-Arevalo et al. 2015). Para o fenótipo estudado em linfócitos humanos, linfócitos B  $CD19^+CD25^+$  foram primeiramente descritos por sua ação imunossupressora sobre células imunes efetoras (de Andres et al. 2014). Após, novos fenótipos com capacidade regulatória surgiram, dentre esses, linfócitos B ( $CD19^+CD24^+CD38^{high}$ ) mostraram capacidade supressiva sobre linfócitos Teff (Blair et al. 2010). Independente do fenótipo denominado, os estudos convergem para uma resposta anti-inflamatória ou imunossupressora desencadeadas principalmente por IL-10, mas também por TGF- $\beta$ . A IL-10 é o mediador mais bem estudado na modulação de células imunes por linfócitos Bregs. Essas citocinas secretadas por linfócitos Breg podem modular diferentes células imunes (Figura 7) tanto em indivíduos saudáveis como em estados patológicos, embora o entendimento desse processo esteja iniciando em comparação, por exemplo, a compreensão sobre linfócitos T regulatórios (Tregs) (Stanic et al. 2014). Nesse contexto, diferentemente dos Tregs que têm sido amplamente estudados, pouco se sabe

sobre o papel do sistema purinérgico nos linfócitos Bregs humanos, o que abre uma nova perspectiva de estudo. Em humanos, linfócitos B ativados com CD40L e IL-4 são capazes de produzir AMP e consequentemente adenosina, pela presença de CD39 e CD73 na membrana plasmática, que por sua vez é capaz de inibir a proliferação de linfócitos Teff (Saze et al. 2013).



**Figura 7. Diferentes células que linfócitos B regulatórios podem modular através de citocinas secretadas (Rosser and Mauri 2015).**

## **OBJETIVOS**

Investigar o efeito do resveratrol e do metotrexato em nanocápsulas sobre o crescimento de glioblastoma multiforme e a modulação do sistema imune e do sistema purinérgico nos efeitos mediados pelo MTX.

### **Objetivos Específicos**

- Comparar a atividade antitumoral do *trans*-resveratrol em nanocápsulas e em solução em ensaios pré-clínicos de glioblastoma (capítulo I).
- Verificar a atividade do metotrexato em nanocápsulas e em solução sob o crescimento de glioblastoma *in vitro* e *in vivo*, buscando elucidar mecanismos além do clássico efeito antimetabólito (capítulo II).
- Verificar o papel do metotrexato na modulação das enzimas E-ENTPDase1/CD39 e ecto-5'-nucleotidase/CD73 e a influência nos linfócitos T do microambiente do glioblastoma (capítulo III).
- Elucidar a função da enzima E-NTPDase1/CD39 e ecto-5'-nucleotidase/CD73 na modulação do sistema imune por linfócitos B regulatórios (capítulo IV).

## CAPÍTULO I

### **Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces *in vitro* and *in vivo* glioma growth**

Fabrizio Figueiró, Andressa Bernardi, Rudimar L. Frozza, Thatiana Terroso, Alfeu Zanotto-Filho, Elisa H. F. Jandrey, José Claudio F. Moreira, Christianne G. Salbego, Maria I. Edelweiss, Adriana R. Pohlmann, Sílvia S. Guterres, Ana Maria O. Battastini

Periódico: **Journal of Biomedical Nanotechnology**

Status: **Publicado**

## **CAPÍTULO II**

### **Pharmacological improvement and preclinical evaluation of methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules in a glioblastoma model**

Fabício Figueiró, Catiúscia P. de Oliveira, Liliana Rockenbach; Franciane B. Mendes;

Letícia S. Bergamin; Elisa Helena F. Jandrey; Maria Isabel Edelweiss; Silvia S.

Guterres; Adriana R. Pohlmann; Ana Maria O. Battastini

Periódico: **Journal of Biomedical Nanotechnology**

Status: **Publicado**

## **CAPÍTULO III**

### **Methotrexate up-regulates the ecto-5'-nucleotidase/CD73 enzyme in cells of the tumor microenvironment in a rat glioma model**

Fabício Figueiró, Catiúscia P. de Oliveira, Liliana Rockenbach; Franciane B. Mendes;  
Letícia S. Bergamin; Elisa Helena F. Jandrey; Jean Sévigny; Silvia S. Guterres; Adriana  
R. Pohlmann; Ana Maria O. Battastini

Periódico: **Purinergic Signalling**

Status: **Manuscrito a ser submetido à publicação**

## **CAPÍTULO IV**

### **Phenotypic and Functional Characteristics of CD39<sup>high</sup> human regulatory B cells (Breg)**

Figueiró F., Muller L., Funk, S., Jackson, E.K., Battastini, A.M.O., Whiteside, T.L.

Periódico: **OncoImmunology**

Status: **Manuscrito submetido à publicação**

**Obs: Esse trabalho foi realizado durante o intercâmbio na Universidade de Pittsburgh, laboratório da Dra. Theresa Whiteside**

## DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar alternativas terapêuticas para o tratamento de glioblastoma multiforme (GBM), além de procurar entender o papel dos sistemas purinérgico e do sistema imune no contexto tumoral. GBM é uma neoplasia do sistema nervoso central extremamente mortal, com sobrevida média de 12 meses, sendo que o tratamento quimioterápico de escolha (temozolomida) não aumenta essa média mais que dois meses (Alifieris and Trafalis 2015). O GBM foi historicamente caracterizado como tumor de origem astrocítica de grau IV, o mais maligno dentre os gliomas. Recentes estudos demonstram a origem desses tumores por células precursoras neuronais que, ao sofrerem mutações, originam células precursoras tumorais com capacidade tanto de começar uma nova neoplasia quanto ser responsável pela recidiva tumoral. De fato, a recorrência é uma das principais razões para a baixa sobrevida dos pacientes com esse tipo de câncer. Portanto, a baixa expectativa de vida dos pacientes está diretamente relacionada à falha da quimioterapia convencional, provavelmente por não combater de forma eficiente células precursoras tumorais (Van Meir et al. 2010).

O GBM se desenvolve em um tecido com complexas barreiras fisiológicas, o que limita a biodisponibilidade dos quimioterápicos e, conseqüentemente, leva à falha terapêutica. Células endoteliais justapostas, que caracterizam a barreira hamatoencefálica, funcionam como um obstáculo físico de transposição de fármacos. Além disso, mecanismos de resistência a multidrogas, através, principalmente, do efluxo de fármacos para o meio extracelular pela glicoproteína-P são apenas algumas das justificativas para o péssimo prognóstico para pacientes com GBM (van Tellingen et al. 2015). Neste contexto, buscam-se estratégias capazes de aumentar a

biodisponibilidade dos quimioterápicos no SNC, onde se destacam sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos.

Nesse trabalho, utilizamos nanocápsulas poliméricas que funcionam como um sistema reservatório, capaz de aumentar a concentração de fármacos no tecido neoplásico. No capítulo I mostramos que o *trans*-resveratrol (RSV), composto já descrito com atividade contra gliomas (Gagliano et al. 2010), quando carregado por nanocápsulas lipídicas (RSV-LNCs) diminuiu *in vitro* a viabilidade das células de GBM na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , diferentemente do RSV em solução que reduziu significativamente a viabilidade das células somente com 25  $\mu\text{M}$  (Capítulo I, Figura 1). Resultados similares, da diferença da toxicidade em concentrações menores, entre RSV e RSV carregado já haviam sido demonstrados com nanopartículas constituídas por polímeros anfifílicos (incorporados com PEG) em células de glioma, justificando o aprofundamento de estudos com essa molécula em nanocápsulas (Shao et al. 2009). A maior atividade nos experimentos *in vitro* pode ser explicada pela maior captação do RSV-LNCs em comparação ao RSV em solução e também ao rápido metabolismo das células cancerígenas, que aumentam a eficiência da captação dessas partículas (Teskac and Kristl 2010). Além disso, uma vez internalizadas, uma única nanocápsula pode carrear várias moléculas de substâncias ativas, no caso o RSV. Esta diminuição na viabilidade celular causada pelo tratamento com RSV-LNCs foi precedida por uma parada no ciclo celular de forma dependente da concentração, na fase S com 25  $\mu\text{M}$  e na fase G<sub>1</sub> com 50  $\mu\text{M}$  (Capítulo I, Figura 2). A inibição da progressão do ciclo celular na fase G<sub>1</sub>, pelo tratamento com RSV (100  $\mu\text{M}$ ), foi previamente mostrada em células U251 de glioma, sendo justificado pela diminuição da ciclina D1, uma proteína importante para a progressão do ciclo celular desde as fases iniciais (Jiang et al. 2005).

Por outro lado, concentrações menores de RSV (30  $\mu$ M) têm sido relacionadas com parada em fases seguintes do ciclo celular, como, por exemplo, acúmulo na fase S em diferentes linhagens de glioma (Filippi-Chiela et al. 2011). Portanto, a inibição na progressão do ciclo celular pelo RSV parece estar intimamente associada à concentração e tipo celular.

Além disso, o tratamento por 24 h com RSV-LNCs levou à morte celular apoptótica ao contrário do RSV em solução que não causou o mesmo efeito (Capítulo I, Figura 3). O RSV tem sido descrito por induzir apoptose em células tumorais por mecanismos variados (Harikumar and Aggarwal 2008), como, por exemplo, aumento da expressão de caspase-3 ativa, aumento da liberação de citocromo-c pelas mitocôndrias (Jiang et al. 2005, Zhang et al. 2007) e diminuição da fosforilação da Akt (Castino et al. 2011). Embora citotóxico e citostático às células tumorais, RSV-LNCs não se mostrou tóxico para as culturas organotípicas, modelo de células neurais saudáveis (Capítulo I, Figura 4). Esse efeito seletivo pode ser compreendido pela maior captação das nanopartículas por células neoplásicas em comparação as células não tumorais (Khuda-Bukhsh et al. 2010).

Em experimentos *in vivo*, utilizando modelo de glioma implantado em cérebro de ratos, observamos uma considerável redução do volume tumoral ( $87\% \pm 27\%$ ) após 10 dias de tratamento com RSV-LNCs. Essa redução foi acompanhada por diminuição de algumas características de malignidade, através de análise histopatológica (Capítulo I, Figura 5, 6 e Tabela 1). Estes efeitos também foram mais pronunciados após tratamento com RSV-LNCs quando comparados com o tratamento com RSV em solução. Previamente, nosso grupo mostrou que essas mesmas nanocápsulas foram capazes de carrear indometacina para a região tumoral de ratos com glioma implantado no cérebro,

enquanto que o fármaco na sua forma livre não foi detectável nesse tecido, estando de acordo com a maior atividade antitumoral *in vivo* da indometacina em LNCs (Bernardi et al. 2009). Além disso, também demonstramos que o próprio RSV atinge mais o SNC de ratos quando carregado em nanocápsulas em comparação ao RSV solução, sem causar aumento em marcadores bioquímicos de toxicidade (Frezza et al. 2010).

Tseng e colaboradores 2004 demonstraram que o tratamento com RSV 40mg/kg foi capaz de diminuir o volume e aumentar a sobrevivência de ratos com glioma implantado no flanco dos animais. Por outro lado, em glioma implantado no cérebro dos ratos uma dose de 100 mg/kg foi necessária para diminuição desses parâmetros (Tseng et al. 2004). Em outro estudo, publicado no ano seguinte à publicação apresentada no capítulo I, foi observado uma maior diminuição no volume tumoral com tratamento do RSV em nanopartículas, em ratos com glioma, na concentração de 15 mg/kg após quatro administrações, quando comparado ao composto em solução (Guo et al. 2013). Esses resultados demonstram que o uso da nanotecnologia é capaz de diminuir a dose necessária capaz de produzir diminuição do volume tumoral em gliomas e estão de acordo com o maior efeito *in vivo* demonstrados em nosso trabalho (capítulo I).

Seguindo nossa pesquisa para novas possibilidades terapêuticas para tratamento de GBM, no Capítulo II, comparamos as atividades do MTX em nanocápsulas lipídicas (MTX-LNCs), MTX em solução e diéster de metotrexato (MTX-(OEt)<sub>2</sub>). Inicialmente, buscamos aumentar a eficiência de encapsulação (EE) do MTX nas LNCs. Em estudo prévio realizou-se a encapsulação do MTX utilizando o polímero poli-caprolactona de massa molecular de 65 kDa e obteve-se uma EE de 18 ± 3% (Oliveira et al. 2013). A fim de tentar melhorar a EE, no presente trabalho, utilizamos o polímero com massa molecular de 14,5 kDa. Verificou-se que a utilização do polímero com menor massa

molecular aumentou a EE do MTX para  $47 \pm 5\%$ . Isso se deve ao possível aumento da interação por pontes de hidrogênio entre o MTX e as LNCs, pelo aumento da porção amorfa nas paredes deste polímero. Juntamente com esse aumento na EE do MTX, a encapsulação desse fármaco demonstrou adequadas características físico-químicas, como diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta (Capítulo II, Tabela 1). Além disso, como mostrado no Capítulo II, Figura 1, MTX-LNCs se mostrou estável após 30 dias de preparação, com valores similares de diâmetro de partícula, concentração de fármaco e índice de polidispersão.

Também investigamos se o aumento da lipofilia do MTX, por inserção de dois ésteres à molécula, poderia aumentar a atividade frente a modelos de glioma, utilizando um diéster de MTX previamente sintetizado (Oliveira et al. 2013) uma vez que moléculas mais lipofílicas conseguem atravessar a BHE mais facilmente.

A partir dessas alternativas tecnológicas, desenvolvemos um *screening* inicial com MTX em solução, MTX em nanocápsulas e com diéster de MTX (MTX-(OEt)<sub>2</sub>) para avaliar a viabilidade sobre células de glioma. Após 24 h de tratamento, observamos que MTX-LNCs reduz a viabilidade de linhagem de glioma C6 com 2  $\mu$ M, diferentemente do MTX e MTX-(OEt)<sub>2</sub> que necessitam 4  $\mu$ M para um efeito significativo (Capítulo II, Figura 2). Como explicado anteriormente, essa diferença pode ser resultado da maior internalização de MTX quando veiculado em LNCs, visto que as nanocápsulas apresentam captação por células tumorais e que são capazes de concentrar várias moléculas de MTX dentro das células. Confirmando esse conceito, aumento da atividade *in vitro* em linhagem de câncer cervical foi demonstrado para MTX carregado por nanopartículas frente ao composto em solução, demonstrando maior captação das nanopartículas pelas células tumorais (Chen J. et al. 2013a).

Visto que MTX e MTX-(OEt)<sub>2</sub> não mostraram diferença de atividade anti-glioma, seguimos os estudos *in vitro* utilizando somente MTX e MTX-LNCs. Os tratamentos com MTX e MTX-LNCs, ambos a 4 µM, foram capazes de extinguir a fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular da linhagem C6 de glioma, aumentando a porcentagem de células na fase G<sub>1</sub> (Capítulo II, Figura 3). A inibição da progressão do ciclo celular é um evento classicamente descrito para o MTX, considerando que inibe a síntese de purinas e pirimidinas. Nesse contexto, o MTX também tem sido descrito por causar o acúmulo de células não só na fase S, mas também na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular (Murawala et al. 2014). Esse aumento de células na fase G<sub>1</sub> pode ser consequência da possível inibição na síntese de proteínas imposta pelo MTX, com consequente bloqueio no *checkpoint* da fase G<sub>1</sub>, limitando a entrada de células na fase S. Além disso, as células que entram na fase S não sintetizam os nucleotídeos necessários à síntese de DNA, uma vez que a síntese de timidina é inibida pelo MTX, diminuindo, assim, as células na fase G<sub>2</sub>/M e a proliferação tumoral.

Além da esperada atividade antiproliferativa, nós também buscamos avaliar o papel citotóxico do MTX na linhagem C6 de glioma. MTX-LNCs induziu as células de glioma à apoptose enquanto MTX em solução, ambos a 4 µM, não causou nenhum efeito nesse ensaio. Novamente, essa maior atividade *in vitro* do MTX quando carregado nas LNCs indica uma maior concentração intracelular em comparação ao fármaco em solução. O MTX foi descrito por causar apoptose em outras células cancerígenas quando carregado por micelas (Chen Y. et al. 2013b) ou nanopartículas (Nogueira et al. 2013) com maior atividade frente ao MTX em solução. A fim de confirmar a indução de apoptose e expandir seu entendimento, nós quantificamos a expressão da caspase-3 ativa após tratamento com MTX-LNCs. O tratamento aumentou a expressão dessa

proteína em relação às LNCs sem o fármaco inserido, o que reforça a indução de apoptose por esse fármaco nanoencapsulado (Capítulo II, Figura 4 e 5).

Buscando avaliar se MTX-LNCs poderia também atuar *in vivo*, nós testamos sua atividade em modelo de glioma implantado em cérebro de ratos. Como visto no Capítulo II, Figura 6, MTX-LNCs diminuiu em 56% o volume tumoral após 10 dias de tratamento em maior proporção que o fármaco em solução (11%). Similarmente ao resultado com MTX em solução, MTX-(OEt)<sub>2</sub> não diminui o volume tumoral (resultados não mostrados), podendo ser explicado pela rápida conversão dos ésteres em MTX *in vivo*. Para confirmar a atividade pro-apoptótica do MTX-LNCs já verificada *in vitro*, nós avaliamos a proporção de apoptose no tecido tumoral após tratamento com MTX-LNCs *in vivo*. O tratamento dos animais com essa formulação aumenta para 55% a porcentagem de apoptose no tecido tumoral, composto predominantemente por células de glioma. Resumidamente, MTX-LNCs diminui o volume tumoral e induz apoptose, em modelo *in vivo* de glioma, em proporções similares de porcentagem. Ainda, verificamos que o tratamento com MTX-LNCs reduz a expressão da proteína antiapoptótica BCL-2 em comparação ao controle. Tomados em conjunto, os resultados apresentados indicam que MTX-LNCs não somente funciona como um fármaco antimetabólito, inibindo a progressão do ciclo celular, mas também é capaz de induzir apoptose nas células de glioma. A combinação dos resultados *in vitro* e *in vivo* sugere uma ativação da via intrínseca da apoptose. O MTX-LNCs funcionaria como um estímulo pró-apoptótico, levando à diminuição da proteína antiapoptótica BCL-2, fazendo com que citocromo *c* seja liberado da mitocôndria para transformar a pró-caspase-3 inativa em caspase-3 ativa, com consequente apoptose celular. MTX carregado

por nanopartículas também foi descrito por aumentar a concentração de caspase-3 ativa em linhagem de adenocarcinoma gástrico e câncer de mama (Afshari et al. 2013).

O Metotrexato possui baixa permeabilidade *in vivo* o que pode levar a uma biodisponibilidade subterapêutica no SNC ou a necessidade de utilização de altas doses desse fármaco para um tratamento de tumores malignos cerebrais (Cooper et al. 2015, Wolff et al. 2011). Pensando nisso, a utilização de nanocápsulas poliméricas aumentou tanto a atividade *in vitro* quanto *in vivo* do MTX. Outros sistemas carreadores também têm sido propostos para sobrepujar problemas farmacocinéticos desse fármaco, podendo diminuir a toxicidade por aumento da especificidade à região tumoral com redução de dose (Abolmaali et al. 2013). Outro dado relevante é que o tratamento dos ratos com MTX-LNC por 10 dias não causou alteração em marcadores bioquímicos como glicose e colesterol e nem em marcadores de toxicidade tecidual, como creatinina, fosfatase alcalina, ALT e AST (Capítulo II, Tabela 2). Por outro lado, após 10 dias de tratamento com MTX-LNCs, houve redução na quantidade de leucócitos (Capítulo II, Tabela 3). Essa diminuição foi principalmente mediada por uma diminuição na população de neutrófilos. Neutropenia é um efeito adverso já descrito para o MTX, mesmo em baixas doses. Apesar de não obrigatoriamente aumentar o risco de infecção, é necessário à avaliação constante dos pacientes em tratamento com esse fármaco, com possíveis ajustes de doses (Inagaki et al. 2014).

Em conjunto, o aumento da atividade do RSV (Capítulo I) e do MTX (Capítulo II) contra GBM quando nanoencapsulados pode ser explicado por uma série de fatores pelos quais as LNCs desempenham sua função de carreadores de fármacos, a citar: as LNCs não são reconhecidas por fagócitos na circulação sistêmica; as LNCs podem atravessar a BHE, uma vez que a mesma se encontra mais permeável nas neoplasias;

esses sistemas de veiculação também conseguem sobrepujar mecanismos de resistência a multidrogas, tanto em células endoteliais como nas próprias células tumorais. Ainda, LNCs, por serem estruturas grandes em comparação as moléculas de RSV e MTX, podem ficar retidas por mais tempo em um sistema linfático deficiente, presente nos tumores, aumentando a concentração de RSV-LNCs e MTX-LNCs nas áreas peritumorais (Brigger et al. 2002, Frank et al. 2015). Portanto, dados da literatura suportam os resultados apresentados nesses capítulos da presente Tese, da maior atividade frente aos compostos em solução, tanto em modelo de glioma *in vitro* quanto *in vivo*. Dessa forma, conclui-se que essas formulações podem ser alternativas promissoras para ensaios clínicos em pacientes com GBM.

Uma terceira hipótese que foi avaliada nessa Tese foi os efeitos do MTX sobre a sinalização purinérgica, especialmente sobre a sinalização da adenosina, e sobre as enzimas extracelulares envolvidas na sua produção.

O MTX tem sido estudado por aumentar a concentração dos nucleotídeos da adenina no meio intracelular, o que poderia levar a um aumento desses nucleotídeos no meio extracelular por gradiente de concentração e/ou exocitose. Uma vez no meio extracelular, esses nucleotídeos, por ação das ecto-nucleotidases, poderiam aumentar a concentração de adenosina que desempenha função imunossupressora em modelo de inflamação em ratos (Montesinos et al. 2007). Além disso, sabe-se que o MTX é capaz de inibir a enzima adenosina deaminase (ADA) de linfócitos Teff, responsável pela metabolização de adenosina à inosina, que ajudaria para a manutenção de altos níveis de adenosina após tratamento com MTX (Mandapathil et al. 2010, Riksen et al. 2006). No capítulo III, mostramos que o MTX pode aumentar a expressão de enzimas do sistema purinérgico ancoradas à membrana plasmática da célula, principalmente a enzima ecto-

5'NT/CD73, culminando em aumento na produção de adenosina no meio extracelular, mecanismo além das atividades já descritas de interferir no equilíbrio de nucleotídeos do meio intra e extracelular e na regulação da ADA.

Primeiramente, mostramos que o tratamento dos ratos com MTX-LNCs por 10 dias não alterou a expressão da enzima E-NTPDase1/CD39 na totalidade das células do microambiente dos gliomas (MAG), através do isolamento e análise do tecido tumoral como um todo. De forma semelhante, a atividade das ectonucleotidases através da incubação com ADP e ATP, também não foi alterada nesse tecido isolado. Especificamente, nas células  $CD3^+CD4^+$ , que são basicamente constituídas por células T auxiliares no microambiente tumoral, também não houve diferença na expressão da enzima CD39 após tratamento com MTX-LNCs. Por outro lado, houve um aumento na expressão da enzima CD39 na superfície de linfócitos  $CD3^+CD8^+$  (Capítulo III, Figura 1D), esse fenótipo caracteriza principalmente linfócitos T-citotóxicos, que já foram descritos por expressarem a enzima CD39 em sua membrana e que sua expressão está relacionada à citotoxicidade dessas células (Gouttefangeas et al. 1992). No entanto, esse trabalho citado, isoladamente, não assegura o total entendimento da enzima CD39 no poder citotóxico dessa subpopulação de linfócitos-T. Recentemente, tem se demonstrado que a presença dessa enzima na membrana de células  $CD8^+CD127^{low}$  é um indicativo de uma subpopulação com capacidade regulatória, capaz de suprimir células efetoras do sistema imune (Parodi et al. 2013), assim como foi previamente demonstrado para os linfócitos Treg clássicos ( $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ ) (Mandapathil et al. 2009a). Portanto, mais estudos são necessários principalmente para delimitar as populações de linfócitos  $CD8^+$  que expressam a enzima CD39 e a função em cada uma delas.

Mostramos também *in vitro* que as células de glioma C6 aumentam a atividade AMPásica após o tratamento com MTX (Capítulo III, Figura 2). Em estudos prévios em nosso laboratório, mostramos que tanto a dexametasona quanto a indometacina, fármacos também com atividade anti-inflamatória, aumentaram a atividade da enzima ecto-5'-NT/CD73, estando de acordo com resultados apresentados para o MTX (Bavaresco et al. 2007, Bernardi et al. 2007). Essa análise nos instigou testar a atividade da enzima ecto-5'-NT/CD73 também em modelo de glioma implantado em cérebro de ratos. Após o tratamento dos animais por 10 dias com MTX-LNCs, observamos um aumento na expressão e na atividade da enzima ecto-5'-NT/CD73 em células do microambiente do glioma (MAG) (Capítulo III, Figura 3A e 3B). Esse aumento geral da expressão de ecto-5'-NT/CD73 é resultado não só do aumento da enzima nas células de glioma, mas também pelo aumento da expressão da ecto-5'-NT/CD73 em células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Capítulo III, Figura 3C e 3D). Esse aumento da expressão em diferentes células do MAG pode elevar à produção de adenosina no tecido tumoral, que já possui concentrações supra-fisiológicas desse nucleosídeo (Wink et al. 2003).

Classicamente, a inibição da enzima ecto-5'-NT/CD73 tem sido estudada como alternativa para diminuir a proliferação de células tumorais, uma vez que superexpressam essa enzima (Corbelini et al. 2015). A inibição da enzima ecto-5'-NT/CD73 pode induzir células neoplásicas à apoptose (Serra et al. 2011), como também demonstrado por nós no trabalho apresentado no anexo 1. Por outro lado, altos níveis de adenosina também podem levar à morte de células tumorais, como previamente descrito para outros fármacos imunossupressores como a dexametasona (Bavaresco et al. 2007) e indometacina (Bernardi et al. 2007) as quais aumentam a expressão da enzima ecto-5'-NT/CD73. Nesse contexto, nossa hipótese é de que a adenosina se ligaria aos seus

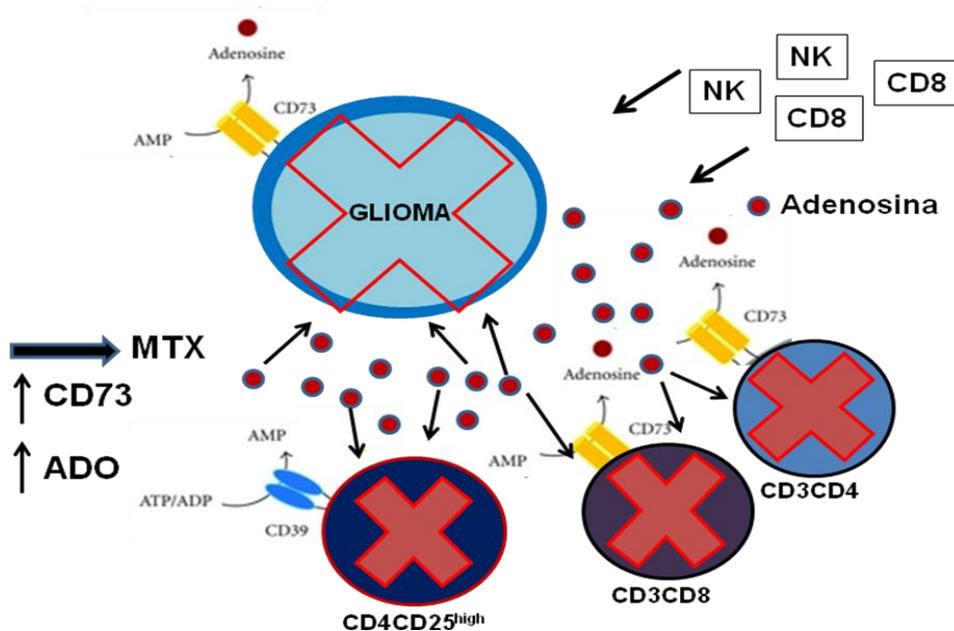
receptores, principalmente receptor A<sub>3</sub> levando a morte das células tumorais (Kim et al. 2012). Esses dois mecanismos antagônicos mediados pela adenosina, produzida pela enzima ecto-5'NT/CD73 no meio extracelular, remete à complexidade desse sistema no contexto neoplásico, onde a faixa de concentração de adenosina é fator fundamental para efeito anti- ou pro-tumoral. No capítulo II demonstramos que o mesmo tratamento aplicado no capítulo III, com MTX-LNCs 1mg/kg/dia por 10 dias, levou a diminuição do volume tumoral. Dessa forma, a redução do glioma pode estar relacionada com o aumento de adenosina no tecido tumoral nesses 10 dias de tratamento, através da ligação aos receptores de adenosina nas próprias células de glioma.

Por outro lado, altos níveis de adenosina no meio extracelular têm sido extensivamente relacionados à supressão de células imune, mediada principalmente por receptor de adenosina A<sub>2A</sub>, o que poderia levar a um ambiente imunossuprimido/pró-tumoral (Sitkovsky 2009). Nesse sentido, o tratamento dos ratos com MTX-LNCs diminuiu a porcentagem de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no microambiente tumoral. Essas células, que constituem principalmente os linfócitos T efetores, podem ter sido moduladas pelos altos níveis de adenosina, gerada pelo aumento da expressão da enzima ecto-5'-NT/CD73 através do tratamento com MTX-LNCs, para não proliferarem e/ou não serem recrutados. O MTX foi descrito por induzir apoptose e deleção clonal em linfócitos T ativados, sendo adenosina parcialmente envolvida nesse efeito (Genestier et al. 1998). Por isso, outros mecanismos inerentes ao MTX, independentes dos mediados pela adenosina, também devem estar atuando na imunossupressão em linfócitos T, como por exemplo, modulação da secreção das citocinas e inibição da síntese de timidina (Genestier et al. 1998, Wessels et al. 2007).

Como dito anteriormente, a inibição de linfócitos Teff pela adenosina é um processo bem definido. No entanto, para nossa surpresa, o tratamento com MTX-LNCs também reduziu a porcentagem dos linfócitos Treg no microambiente tumoral (Capítulo III, Figura 5D). Embora linfócitos Treg possuam receptor de adenosina  $A_{2A}$ , não há estudos que demonstrem uma possível supressão desses linfócitos mediados pelo MTX e/ou pela adenosina. De fato, o tratamento com MTX-LNCs aumenta ainda mais a concentração de adenosina no microambiente dos gliomas, ao qual já possui altos níveis desse nucleosídeo, através do aumento da expressão da enzima ecto-5'-NT/CD73. Esses altos níveis de adenosina com o tratamento diário por 10 dias, juntamente com outros mecanismos atribuídos ao MTX, poderia não apenas suprimir linfócitos Teff, mas também linfócitos Treg, que possuem papel central na imunossupressão pró-tumoral em gliomas. Com a diminuição de linfócitos Treg no MAG, e consequente diminuição da imunossupressão, células efetoras poderiam ser recrutadas e diferenciadas a fim de transformar o sistema imune de pró- para antitumoral. Diferentes tratamentos têm sido descritos por diminuir linfócitos Treg de maneira independente à adenosina, por exemplo, curcumina foi capaz de diminuir a supressão mediada por Tregs, diminuindo também a expressão de marcadores como CD25 e Foxp3, o que pode ser explicado pela diminuição da produção de IL-2, fundamental para essas células regulatórias *in vitro* (Zhao et al. 2012). No mesmo sentido, sorafenibe aumenta a resposta de células efetoras por diminuir a supressão mediada por linfócitos Treg em pacientes com carcinoma hepatocelular, o que foi correlacionada com a produção das citocinas IL-2 e IL-6 (Cabrera et al. 2012). Em outro estudo, ciclofosfamida, um quimioterápico com características imunossupressivas, diminuiu seletivamente a quantidade de linfócitos Treg circulantes em pacientes com câncer terminal, permitindo o reestabelecimento das

funções de linfócitos Teff e células NK, com um melhor controle no crescimento tumoral (Ghiringhelli et al. 2007).

Resumidamente, como mostrado no esquema 1, postulamos que o tratamento realizado com MTX-LNCs é capaz de aumentar a expressão da enzima ecto-5'-NT/CD73 no microambiente dos gliomas, a qual já possui níveis elevados de adenosina, favorecendo ainda mais a formação de adenosina pericelular. O aumento da adenosina poderia aumentar a morte das células de glioma *via* receptor A3 de adenosina e/ou contribuir para a diminuição da resposta imune pró-tumoral no MAG, pela diminuição de linfócitos Treg. A diminuição desses linfócitos poderia favorecer o recrutamento de células do sistema imune capaz de estabelecer uma imunidade antitumoral. No entanto, um aprofundamento desse estudo é necessário, utilizando agonistas e antagonistas de receptores P1 de adenosina em co-cultura entre células de glioma e linfócitos, para melhor compreendermos o papel do aumento da expressão de ecto-5'-NT/CD73 e adenosina no MAG.



**Esquema 1. Metotrexato aumenta a expressão da enzima CD73 nas células de glioblastoma e em linfócitos T auxiliares (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) e T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>).**

O acúmulo de adenosina poderia levar a morte nas células de gliomas e supressão de linfócitos T, incluindo T regulatórios (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>), o que poderia causar o recrutamento de células imune e reestabelecimento da imunidade anti-tumoral.

No capítulo IV buscamos explorar o papel do sistema purinérgico em linfócitos B regulatórios (Bregs) que, diferentemente dos linfócitos Treg, ainda não possuíam estudos sobre a função das enzimas CD39 e ecto-5'-NT/CD73 em humanos. Nos linfócitos Treg, a enzima CD39 é fundamental para a produção de AMP, o qual será convertido à adenosina por ação de enzimas de células circundantes. A adenosina, por sua vez, possui ação imunossupressora com importante papel em doenças autoimunes e câncer (Andre et al. 2009, Mandapathil et al. 2009b). Sobre linfócitos B, Saze e colaboradores 2013 mostraram que linfócitos B ativados são capazes de suprimir linfócitos Teff enquanto que linfócitos B não ativados são capazes de aumentar a proliferação dessas células (Saze et al. 2013). De fato, linfócitos B classicamente foram descritos por aumentar as respostas imunológicas, através, principalmente, da produção de anticorpos que coordenam o sistema imune. No entanto, estudos recentes demonstram que uma subpopulação desses linfócitos é capaz também de suprimir a resposta imune através principalmente da produção de IL-10 (Rincon-Arevalo et al. 2015).

No capítulo IV, demonstramos que a enzima ENTPDase1/CD39 possui papel central na regulação mediada por linfócitos B humanos. Anteriormente havia sido descrito que linfócitos B co-expressam as enzimas CD39 e ecto-5'-NT/CD73 em mais de 80% das células, sendo que em torno 90% dos linfócitos B são CD39<sup>+</sup> (Saze et al.

2013). Partindo desse princípio, demonstramos que linfócitos B ativados com IL-4 e CD40L aumentam a expressão da enzima CD39, produzindo uma subpopulação CD39<sup>high</sup> (Capítulo IV, Figura 1C e 1D), enquanto a enzima ecto-5'-NT/CD73 não sofre ação dessa ativação exógena. O aumento da expressão da enzima CD39 em um estado ativado nos instigou estudar mais profundamente essa subpopulação, uma vez que trabalhos anteriores demonstraram o papel central dessa enzima na ação de linfócitos Treg (Mandapathil et al. 2009a).

Linfócitos Breg foram inicialmente descritos em camundongos com um fenótipo bem diferente dos identificados posteriormente em humanos. Fenotipicamente, essas espécies diferem consideravelmente, mas convergem no papel central desempenhado pela IL-10 na imunomodulação (Stanic et al. 2014). O fenótipo de linfócitos Bregs ainda não está totalmente delimitado e estudos demonstram que linfócitos B humanos CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+/high</sup> e CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+/high</sup>CD38<sup>high</sup> têm capacidade de suprimir células efetoras (Blair et al. 2010, de Andres et al. 2014, Kessel et al. 2012). No capítulo IV, Figura 3, demonstramos que linfócitos B CD39<sup>high</sup> possuem expressão de marcadores já descritos para linfócitos Breg humanos, como, por exemplo, aumentada expressão dos marcadores CD25 e CD38. Além disso, também demonstramos que linfócitos B CD39<sup>inter</sup> e CD39<sup>high</sup> possuem maior expressão da enzima ecto-5'-NT/CD73 (aproximadamente 90%) em relação a linfócitos CD39<sup>neg</sup> (aproximadamente 70%, Capítulo IV, Figura 2). Estudos em camundongos demonstram a importância da enzima ecto-5'-NT/CD73 dos linfócitos B na supressão de células efetoras e a contribuição dessa enzima na modulação do sistema imune e progressão tumoral (Forte et al. 2012, Kaku et al. 2014).

De acordo com essa alta expressão das enzimas CD39 e ecto-5'-NT/CD73 na subpopulação de linfócitos B CD39<sup>high</sup>, uma aumentada concentração de AMP e adenosina foi produzida por essas células. Linfócitos B CD39<sup>high</sup> produzem aproximadamente o dobro de AMP e adenosina que linfócitos B CD39<sup>inter</sup>, enquanto que linfócitos CD39<sup>neg/low</sup> produzem quantidades irrisórias desse nucleotídeo e nucleosídeo. A fim de confirmar esses resultados e sua funcionalidade, bloqueamos a enzima com um anticorpo específico à proteína CD39. Os resultados demonstram que a enzima CD39 está claramente envolvida com os altos níveis de AMP e adenosina, uma vez que sua inibição reduz significativamente a produção desse nucleotídeo e nucleosídeo (Capítulo IV, Figura 4A e 4B). Esses resultados sugerem que o aumento da proporção de linfócitos B CD39<sup>high</sup> após ativação, com produção de altos níveis de AMP e adenosina, pode desempenhar um papel supressor que vai além da histórica função de linfócitos B na secreção de anticorpos.

Buscando confirmar essa hipótese, resolvemos analisar a produção de IL-10 pelos linfócitos B CD39<sup>neg</sup>, CD39<sup>inter</sup> e CD39<sup>high</sup>. Os resultados mostraram que a subpopulação CD39<sup>high</sup> além de produzir altos níveis de adenosina, também produz mais IL-10 que as outras duas subpopulações, que é a principal citocina supressora descrita para linfócitos Breg (Stanic et al. 2014). Recentemente foi demonstrada uma correlação entre IL-10 e a produção de adenosina em linfócitos B de camundongos. Células B1 de camundongo e *knockout* para IL-10 tiveram uma reduzida produção de adenosina, mostrando que pode haver uma relação entre a quantidade de IL-10 e a produção de adenosina, as quais podem estar trabalhando em sincronia para mediar à supressão desempenhada por linfócitos Breg (Kaku et al. 2014).

Outro fator importante demonstrado no trabalho apresentado no capítulo IV (Figuras 6) é a proliferação das subpopulações de linfócitos B. A porção CD39<sup>high</sup> desses linfócitos possuem alta capacidade proliferativa, ao contrário das frações CD39<sup>low</sup> e CD39<sup>inter</sup> que praticamente não proliferam quando ativadas. Esse aumento na proliferação da subpopulação CD39<sup>high</sup> nos mostra que não apenas a expressão da enzima CD39 pode estar sendo aumentada, mas que as células CD39<sup>high</sup> estão produzindo células filhas com uma alta expressão dessa enzima. Nesse sentido, analisamos a produção de citocinas pelas subpopulações CD39<sup>low</sup>, CD39<sup>inter</sup> e CD39<sup>high</sup>, como visto no Capítulo IV Tabela 1, linfócitos B CD39<sup>high</sup> secretam uma maior quantidade de IL-6, GM-CSF e TNF- $\alpha$  do que as outras duas subpopulações. Linfócitos-B têm sido descritos por aumentar a quantidade de IL-6 quando ativados (Yehudai et al. 2012) e esse aumento tem sido correlacionado com aumento da diferenciação de linfócitos Breg (Rosser et al. 2014). De forma semelhante, GM-CSF tem sido descrito por ajudar na diferenciação de linfócitos B *naive* em linfócitos Breg (Deng and Galipeau 2012). TNF- $\alpha$  é outra citocina produzida em maior escala em linfócitos B CD39<sup>high</sup> e tem sido relacionada com proliferação de linfócitos B de forma autócrina (Boussiotis et al. 1994). Em conjunto, o perfil de liberação de citocinas mediado em proporções maiores para a subpopulação CD39<sup>high</sup>, em comparação a CD39<sup>neg</sup> e CD39<sup>inter</sup>, está em concordância com o maior poder proliferativo dessa fração celular.

Nesse contexto, sabendo que linfócitos B expressam os receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub> de adenosina (Saze et al. 2013), nós decidimos analisar se a intervenção nesses receptores poderia modular diferentemente a proliferação da subpopulação de linfócitos B CD39<sup>high</sup>. Recentemente, o nucleotídeo AMP foi descrito como um potente agonista do receptor A<sub>1</sub> de adenosina (Rittiner et al. 2012), por esse motivo, resolvemos testar se o

tratamento com ATP e ATP mais AMPCP, um potente inibidor da enzima ecto-5'-NT/CD73 que mantém o AMP no meio extracelular, seria capaz de interferir na proliferação da subpopulação CD39<sup>high</sup> de linfócitos B. No entanto, o excesso de adenosina ou AMP no meio extracelular não inibiu a proliferação nem a porcentagem da fração CD39<sup>high</sup> de linfócitos B (resultados não mostrados). Considerando que nem AMP nem adenosina inibem a subpopulação CD39<sup>high</sup>, decidimos testar se o uso de agonistas e antagonistas específicos para os receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>3</sub>, presentes em linfócitos B, poderiam mediar algum efeito na proliferação dessas células. Primeiramente, a ligação de um agonista específico ao receptor A<sub>1</sub> aumentou a proporção de linfócitos B CD39<sup>high</sup>, ao qual foi revertido pelo uso do antagonista desse receptor (Capítulo IV, Figura 7B). Esse resultado sugere que a modulação do receptor A<sub>1</sub>, mediado por adenosina e/ou AMP, pode levar a aumento da porcentagem de células Breg (CD39<sup>high</sup>).

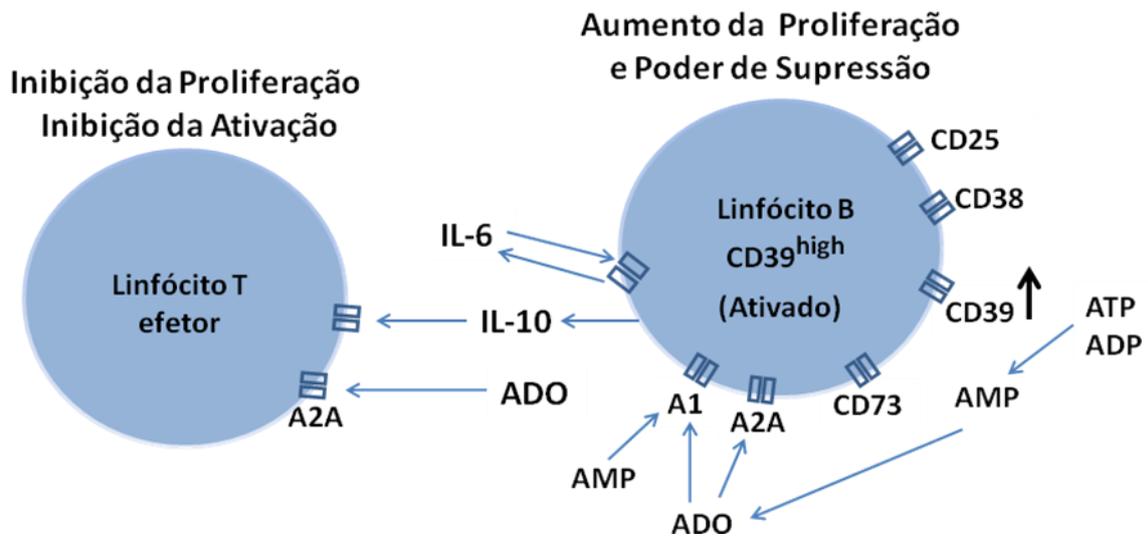
Além disso, como demonstrado no Capítulo IV (Figura 7A), o agonista do receptor A<sub>2A</sub> aumenta a proliferação e a porcentagem de células CD39<sup>high</sup> as quais tiveram seus valores não apenas revertidos pelo antagonista desse receptor, mas reduzidos além dos níveis de controle. Esse resultado conota um efeito endógeno da adenosina, que pode estar sendo revertido através do uso de antagonista, uma vez que ele isoladamente já causou diminuição na proliferação e porcentagem dos linfócitos B CD39<sup>high</sup>. O receptor A<sub>2A</sub> é o principal receptor adenosinérgico na modulação do sistema imune. A expressão do receptor A<sub>2A</sub> em linfócitos Teff, por exemplo, tem sido relacionada à ação inibitória enquanto Treg são ativados via receptor A<sub>2A</sub> de adenosina (Ohta and Sitkovsky 2014). Dessa forma, assim como linfócitos Treg, linfócitos Breg parecem ser estimulados pela adenosina via receptores A<sub>2A</sub>.

Portanto, os efeitos proliferativos na subpopulação CD39<sup>high</sup> mediados via receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> possivelmente são mediados pelos altos níveis de adenosina produzidos por essas células, embora não possamos descartar que o AMP, sabidamente um agonista de receptor A<sub>1</sub> (Rittiner et al. 2012), possa estar desempenhando algum efeito via esse receptor.

Considerando que a subpopulação CD39<sup>high</sup> de linfócitos B apresenta fenótipo e mediadores imunossupressores como IL-10 e altos níveis de adenosina, nosso próximo passo foi avaliar o efeito das três diferentes subpopulações de linfócitos B sobre a ativação e proliferação de linfócitos Teff. Somente os linfócitos B CD39<sup>high</sup> foram capazes de diminuir tanto a ativação quanto a proliferação dos linfócitos Teff (Capítulo IV, Figura 8). Essa capacidade supressiva pode ser explicada pelos altos níveis de adenosina produzida por essas células, assim como pelos elevados níveis de IL-10 em comparação aos outras subpopulações de linfócitos B. Estudos em camundongos demonstraram que a adenosina tem um importante papel na imunossupressão mediado por linfócitos B. Entretanto, linfócitos B de camundongo apresentam diferentes níveis de expressão da enzima ecto-5'-NT/CD73 que é dependente da subpopulação investigada (Kaku et al. 2014). Por outro lado, linfócitos Treg humanos têm sido amplamente estudados quanto às enzimas CD39 e ecto-5'-NT/CD73 e o poder supressivo mediado pela adenosina sobre células imunes efectoras, principalmente via receptor A<sub>2A</sub> de adenosina (Mandapathil et al. 2010). Por fim, analisamos a liberação de citocinas após co-cultura entre as diferentes subpopulações de linfócitos B e linfócitos Teff. O capítulo IV Tabela 2 demonstra um aumento na produção de IL-6 na co-cultura com a fração CD39<sup>high</sup> em comparação às células Teff e em relação as frações CD39<sup>neg</sup> e CD39<sup>inter</sup> de linfócitos B. Além disso, linfócitos B CD39<sup>high</sup> produziram concentrações

significativamente elevadas de IL-10 em comparação aos linfócitos Teff, diferentemente das subpopulações CD39<sup>neg</sup> e CD39<sup>inter</sup> que não alcançaram significância. A IL-6 promove diretamente a diferenciação de linfócitos Breg e aumenta a produção de IL-10, sugerindo que essas citocinas podem desempenhar conjuntamente o papel supressivo de linfócitos Breg (Rosser et al. 2014).

Resumidamente, linfócitos B quando ativados demonstram característica supressiva sobre linfócitos Teff (Saze et al. 2013). Além disso, já foram caracterizados diferentes fenótipos de linfócitos B com características supressivas sobre o sistema imune (Blair et al. 2010, Kessel et al. 2012). Complementarmente, foi descrito que uma subpopulação de linfócitos B de camundongos possui superexpressão da enzima ecto-5'-NT/CD73, mostrando capacidade supressiva em células imunes (Kaku et al. 2014). No capítulo IV dessa tese, como resumido no esquema 2, demonstramos que linfócitos B humanos CD39<sup>high</sup> possuem marcadores de linfócitos Breg, alta expressão da enzima ecto-5'-NT/CD73, proliferam quando ativados, produzem altos níveis de adenosina e IL-10 e são capazes de inibir linfócitos T efetores. Portanto, essa é a primeira vez que é demonstrado o envolvimento da enzima CD39 na mediação de atividade imunossupressora por linfócitos B humanos, sugerindo um possível novo marcador fenotípico e funcional para linfócitos B regulatórios.



**Esquema 2. Linfócitos B ativados possuem uma fração que altamente expressa a enzima CD39.** Linfócitos B CD39<sup>high</sup> expressam marcadores regulatórios como CD25 e CD38, além de produzir altos níveis de adenosina (ADO) e interleucina-10 (IL-10). Adenosina pode tanto ativar os próprios linfócitos B CD39<sup>high</sup> a proliferarem quanto suprimir linfócitos efetores em cooperação com IL-10.

## CONCLUSÕES

### Gerais

- ✓ A veiculação do composto resveratrol e do fármaco metotrexato por nanocápsulas lipídicas foi capaz de aumentar a resposta anti-tumoral desses compostos em modelos pré-clínicos de glioblastoma.
- ✓ O sistema purinérgico, principalmente via hidrólise de ATP à adenosina pelas enzimas CD39 e ecto-5'NT/CD73, tem papel importante na modulação do sistema imune através de linfócitos B e T regulatórios (Breg e Treg).

### Específicas

- ✓ Resveratrol quando carregado por nanocápsulas aumenta a resposta contra glioblastoma em comparação ao composto em solução, sugerindo um aumento da biodisponibilidade intracelular (*in vitro*) e intratumoral (*in vivo*).
- ✓ Em concordância, metotrexato em nanocápsulas (MTX-LNCs) também diminuiu em proporções maiores o crescimento de glioblastoma em relação ao fármaco não carregado.
- ✓ O efeito antiglioma mediado por MTX-LNCs pode ser explicado não somente pelo clássico efeito antiproliferativo, mas pela indução de apoptose através diminuição da proteína antiapoptótica BCL-2 e aumento da proteína caspase-3 ativa, sugerindo ativação da via intrínseca da apoptose.
- ✓ O Metotrexato foi capaz de aumentar a expressão e a atividade da enzima ecto-5'-NT/CD73 em células do microambiente de ratos com glioblastoma implantado, podendo assim gerar adenosina por um mecanismo ainda não descrito para esse fármaco.

- ✓ A adenosina gerada em concentrações suprafisiológicas e por tempo prolongado de tratamento pode ter contribuído não somente para a diminuição dos linfócitos T efetores, mas também para a diminuição dos linfócitos T regulatórios no microambiente do glioblastoma.
- ✓ Em relação aos linfócitos B, uma fração que altamente expressa a enzima CD39 (CD39<sup>high</sup>) possui características fenotípicas e funcionais de linfócitos B regulatórios (Breg).
- ✓ Linfócitos Breg produzem altos níveis de AMP e adenosina e podem ser modulados pelos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>, mas principalmente por ativação autocrina através da adenosina em receptor A<sub>2A</sub>.
- ✓ Linfócitos Breg (CD39<sup>high</sup>) foram capazes também de inibir a ativação e proliferação de linfócitos T efetores, mostrando capacidade supressiva sobre o sistema imune.

## **PERSPECTIVAS**

I. Determinar parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos do RSV-LNCs e MTX-LNCs em ratos.

II. Desenvolver e validar nanocápsulas estéreis que possam ser administradas em ensaios clínicos com esses compostos.

III. Determinar qual o envolvimento molecular do aumento de adenosina após tratamento com MTX na redução do volume tumoral através do uso de agonistas e antagonistas dos receptores de adenosina, em co-cultura entre linfócitos e células de glioblastoma.

IV. Investigar qual o mecanismo pelo qual MTX reduz a quantidade de linfócitos T regulatórios no microambiente tumoral, através do uso de agonistas e antagonistas dos receptores de adenosina em co-cultura entre esses linfócitos T isolados e células de glioblastoma.

VI. Avaliar a frequência e importância dos linfócitos B regulatórios na progressão de glioblastoma, em relação às enzimas purinérgicas CD39 e CD73, em sangue periférico de pacientes com glioblastoma.

## REFERÊNCIAS

- Abbracchio MP, Burnstock G. 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64: 445-475.
- Abolmaali SS, Tamaddon AM, Dinarvand R. 2013. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 1115-1130.
- Afshari M, Derakhshandeh K, Hosseinzadeh L. 2013. Characterisation, cytotoxicity and apoptosis studies of methotrexate-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles. *J Microencapsul*.
- Albesiano E, Han JE, Lim M. 2010. Mechanisms of local immunoresistance in glioma. *Neurosurg Clin N Am* 21: 17-29.
- Alifieris C, Trafalis DT. 2015. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther*.
- Alvarez-Roman R, Barre G, Guy RH, Fessi H. 2001. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur J Pharm Biopharm* 52: 191-195.
- Amu S, Tarkowski A, Dorner T, Bokarewa M, Brisslert M. 2007. The human immunomodulatory CD25<sup>+</sup> B cell population belongs to the memory B cell pool. *Scand J Immunol* 66: 77-86.
- Andre S, Tough DF, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. 2009. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol* 174: 1575-1587.
- Balkwill F, Coussens LM. 2004. Cancer: an inflammatory link. *Nature* 431: 405-406.
- Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. 2012. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*.
- Bastid J, et al. 2015. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res* 3: 254-265.
- Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Wink MR, Battastini AM. 2007. Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity in C6 rat glioma cell line. *J Neurooncol* 84: 1-8.
- Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Canedo A, Battastini AM. 2008. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem* 319: 61-68.
- Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. 2012. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol* 33: 231-237.

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

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

Bernardi A, Braganhol E, Jager E, Figueiro F, Edelweiss MI, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AM. 2009. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Lett* 281: 53-63.

Beyer M, Schumak B, Weihrauch MR, Andres B, Giese T, Endl E, Knolle PA, Classen S, Limmer A, Schultze JL. 2012. In vivo expansion of naive CD4+ CD25(high) FOXP3+ regulatory T cells in patients with colorectal carcinoma after IL-2 administration. *PLoS One* 7: e30422.

Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 32: 129-140.

Borsellino G, et al. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110: 1225-1232.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112: 358-404.

Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfeld AE. 1994. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7007-7011.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Braganhol E, et al. 2012. Overexpression of NTPDase2 in gliomas promotes systemic inflammation and pulmonary injury. *Purinergic Signal* 8: 235-243.

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

Brown VA, et al. 2010. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res* 70: 9003-9011.

Burnstock G. 2004. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem* 4: 793-803.

Burnstock G, Boeynaems JM. 2014. Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal* 10: 529-564.

Cabrera R, Ararat M, Xu Y, Brusko T, Wasserfall C, Atkinson MA, Chang LJ, Liu C, Nelson DR. 2012. Immune modulation of effector CD4<sup>+</sup> and regulatory T cell function by sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62: 737-746.

Cappellari AR, Vasques GJ, Bavaresco L, Braganhol E, Battastini AM. 2012. Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion. *Mol Cell Biochem* 359: 315-322.

Castino R, Pucer A, Veneroni R, Morani F, Peracchio C, Lah TT, Isidoro C. 2011. Resveratrol reduces the invasive growth and promotes the acquisition of a long-lasting differentiated phenotype in human glioblastoma cells. *J Agric Food Chem* 59: 4264-4272.

Cekic C, Linden J. 2014. Adenosine A2A receptors intrinsically regulate CD8<sup>+</sup> T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 74: 7239-7249.

Chan AJ, Rajakumar I. 2014. High-dose methotrexate in adult oncology patients: a case-control study assessing the risk association between drug interactions and methotrexate toxicity. *J Oncol Pharm Pract* 20: 93-99.

Chan KM, Delfert D, Junger KD. 1986. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157: 375-380.

Chen J, Huang L, Lai H, Lu C, Fang M, Zhang Q, Luo X. 2013a. Methotrexate-Loaded PEGylated Chitosan Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and in Vitro and in Vivo Antitumoral Activity. *Mol Pharm*.

Chen Y, Zhang W, Gu J, Ren Q, Fan Z, Zhong W, Fang X, Sha X. 2013b. Enhanced antitumor efficacy by methotrexate conjugated Pluronic mixed micelles against KBv multidrug resistant cancer. *Int J Pharm* 452: 421-433.

Chinot OL, et al. 2014. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 370: 709-722.

Colombo MP, Piconese S. 2007. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 7: 880-887.

Cooper I, et al. 2015. Combined local blood-brain barrier opening and systemic methotrexate for the treatment of brain tumors. *J Cereb Blood Flow Metab*.

Corbelini PF, Figueiro F, das Neves GM, Andrade S, Kawano DF, Oliveira Battastini AM, Eifler-Lima VL. 2015. Insights into Ecto-5'-Nucleotidase as a New Target for Cancer Therapy: A Medicinal Chemistry Study. *Curr Med Chem*.

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

Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. 2002. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 19: 99-134.

de Andres C, Tejera-Alhambra M, Alonso B, Valor L, Teijeiro R, Ramos-Medina R, Mateos D, Faure F, Sanchez-Ramon S. 2014. New regulatory CD19(+)CD25(+) B-cell subset in clinically

isolated syndrome and multiple sclerosis relapse. Changes after glucocorticoids. *J Neuroimmunol* 270: 37-44.

Deng J, Galipeau J. 2012. Reprogramming of B cells into regulatory cells with engineered fusokines. *Infect Disord Drug Targets* 12: 248-254.

Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. 2012. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 14 Suppl 5: v1-49.

Dukic S, Heurtaux T, Kaltenbach ML, Hoizey G, Lallemand A, Gourdiere B, Vistelle R. 1999. Pharmacokinetics of methotrexate in the extracellular fluid of brain C6-glioma after intravenous infusion in rats. *Pharm Res* 16: 1219-1225.

Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Zamin LL, Lenz G. 2011. Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS One* 6: e20849.

Forte G, Sorrentino R, Montinaro A, Luciano A, Adcock IM, Maiolino P, Arra C, Cicala C, Pinto A, Morello S. 2012. Inhibition of CD73 improves B cell-mediated anti-tumor immunity in a mouse model of melanoma. *J Immunol* 189: 2226-2233.

Frank LA, Contri RV, Beck RC, Pohlmann AR, Guterres SS. 2015. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*.

Frantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA. 2005. Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res* 96: 15-26.

Frezza RL, Bernardi A, Paese K, Hoppe JB, da Silva T, Battastini AM, Pohlmann AR, Guterres SS, Salbego C. 2010. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *J Biomed Nanotechnol* 6: 694-703.

Gagliano N, Aldini G, Colombo G, Rossi R, Colombo R, Gioia M, Milzani A, Dalle-Donne I. 2010. The potential of resveratrol against human gliomas. *Anticancer Drugs* 21: 140-150.

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

Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP. 1998. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *Journal of Clinical Investigation* 102: 322-328.

Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, Solary E, Le Cesne A, Zitvogel L, Chauffert B. 2007. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 56: 641-648.

Gilbert MR, et al. 2013. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol* 31: 4085-4091.

Gilbert MR, et al. 2014. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 370: 699-708.

Gouttefangeas C, Mansur I, Schmid M, Dastot H, Gelin C, Mahouy G, Boumsell L, Bensussan A. 1992. The CD39 molecule defines distinct cytotoxic subsets within alloactivated human CD8-positive cells. *Eur J Immunol* 22: 2681-2685.

Griffiths RW, Elkord E, Gilham DE, Ramani V, Clarke N, Stern PL, Hawkins RE. 2007. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol Immunother* 56: 1743-1753.

Grim J, Chladek J, Martinkova J. 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin Pharmacokinet* 42: 139-151.

Guo W, Li A, Jia Z, Yuan Y, Dai H, Li H. 2013. Transferrin modified PEG-PLA-resveratrol conjugates: in vitro and in vivo studies for glioma. *Eur J Pharmacol* 718: 41-47.

Gupta SC, Kannappan R, Reuter S, Kim JH, Aggarwal BB. 2011. Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215: 150-160.

Harikumar KB, Aggarwal BB. 2008. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 7: 1020-1035.

Hausler SF, et al. 2011. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 60: 1405-1418.

Hegi ME, et al. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 997-1003.

Huennekens FM. 1994. The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. *Adv Enzyme Regul* 34: 397-419.

Illes P, Klotz KN, Lohse MJ. 2000. Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 295-298.

Inagaki J, Fukano R, Kodama Y, Nishimura M, Shimokawa M, Okamura J. 2014. Safety and efficacy of low-dose methotrexate for pediatric patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 93: 645-651.

Jang M, Pezzuto JM. 1999. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exp Clin Res* 25: 65-77.

Jang M, et al. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220.

Jiang H, et al. 2005. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol Cancer Ther* 4: 554-561.

Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB. 2008. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 57: 123-131.

Jose S, Anju SS, Cinu TA, Aleykutty NA, Thomas S, Souto EB. 2014. In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. *Int J Pharm* 474: 6-13.

Jung KH, Lee JH, Park JW, Quach CH, Moon SH, Cho YS, Lee KH. 2014. Resveratrol-loaded polymeric nanoparticles suppress glucose metabolism and tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Pharm* 478: 251-257.

Kaku H, Cheng KF, Al-Abed Y, Rothstein TL. 2014. A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. *J Immunol* 193: 5904-5913.

Katz SI, Parker D, Turk JL. 1974. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature* 251: 550-551.

Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, Toubi E. 2012. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev* 11: 670-677.

Khuda-Bukhsh AR, Bhattacharyya SS, Paul S, Boujedaini N. 2010. Polymeric nanoparticle encapsulation of a naturally occurring plant scopoletin and its effects on human melanoma cell A375. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 8: 853-862.

Kim TH, Kim YK, Woo JS. 2012. The adenosine A3 receptor agonist Cl-IB-MECA induces cell death through Ca(2)(+)/ROS-dependent down regulation of ERK and Akt in A172 human glioma cells. *Neurochem Res* 37: 2667-2677.

Knowles AF. 2011. The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signal* 7: 21-45.

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

Kumar V. 2013. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signal* 9: 145-165.

Kundu JK, Surh YJ. 2008. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett* 269: 243-261.

Lacroix M, et al. 2001. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95: 190-198.

Lavoie EG, Kukulski F, Levesque SA, Lecka J, Sevigny J. 2004. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem Pharmacol* 67: 1917-1926.

Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. 2001. Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol* 159: 779-786.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109.

Maeda H, Nakamura H, Fang J. 2013. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 65: 71-79.

Majumdar S, Aggarwal BB. 2001. Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha phosphorylation and degradation. *J Immunol* 167: 2911-2920.

Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, Whiteside TL. 2009a. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods* 346: 55-63.

Mandapathil M, Szczepanski MJ, Szajnik M, Ren J, Lenzner DE, Jackson EK, Gorelik E, Lang S, Johnson JT, Whiteside TL. 2009b. Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 15: 6348-6357.

Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, Lang S, Jackson EK, Gorelik E, Whiteside TL. 2010. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem* 285: 7176-7186.

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

McGuire JJ. 2003. Anticancer antifolates: current status and future directions. *Curr Pharm Des* 9: 2593-2613.

Mediero A, Perez-Aso M, Cronstein BN. 2013. Activation of adenosine A(2A) receptor reduces osteoclast formation via PKA- and ERK1/2-mediated suppression of NFkappaB nuclear translocation. *Br J Pharmacol* 169: 1372-1388.

Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, Wilder TF, Fernandez P, Cronstein BN. 2007. The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis Rheum* 56: 1440-1445.

Montesinos MC, Desai A, Delano D, Chen JF, Fink JS, Jacobson MA, Cronstein BN. 2003. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum* 48: 240-247.

Morabito L, Montesinos MC, Schreiber DM, Balter L, Thompson LF, Resta R, Carlin G, Huie MA, Cronstein BN. 1998. Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a

mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *J Clin Invest* 101: 295-300.

Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJ, Salbego CG, Lenz G, Battastini AM. 2005. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurooncol* 71: 135-140.

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

Muller-Haegeler S, Muller L, Whiteside TL. 2014. Immunoregulatory activity of adenosine and its role in human cancer progression. *Expert Rev Clin Immunol* 10: 897-914.

Murawala P, Tirmale A, Shiras A, Prasad BL. 2014. In situ synthesized BSA capped gold nanoparticles: effective carrier of anticancer drug methotrexate to MCF-7 breast cancer cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 34: 158-167.

Nakada M, Furuta T, Hayashi Y, Minamoto T, Hamada J. 2012. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Front Oncol* 2: 98.

Nieto-Sampedro M, Valle-Argos B, Gomez-Nicola D, Fernandez-Mayoralas A, Nieto-Diaz M. 2011. Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune System. *Clin Med Insights Oncol* 5: 265-314.

Nogueira DR, Tavano L, Mitjans M, Perez L, Infante MR, Vinardell MP. 2013. In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. *Biomaterials* 34: 2758-2772.

Novelle MG, Wahl D, Dieguez C, Bernier M, de Cabo R. 2015. Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go? *Ageing Res Rev* 21: 1-15.

Oh HK, Sin JI, Choi J, Park SH, Lee TS, Choi YS. 2012. Overexpression of CD73 in epithelial ovarian carcinoma is associated with better prognosis, lower stage, better differentiation and lower regulatory T cell infiltration. *J Gynecol Oncol* 23: 274-281.

Ohta A, Sitkovsky M. 2014. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol* 5: 304.

Oliveira C, Venturini C, Donida B, Poletto F, Guterres S, Pohlmann A. 2013. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter* 9: 1141-1150.

Ostrom QT, et al. 2014. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol* 16: 896-913.

Parodi A, et al. 2013. CD39 is highly involved in mediating the suppression activity of tumor-infiltrating CD8+ T regulatory lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 62: 851-862.

- Perez-Herrero E, Fernandez-Medarde A. 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*.
- Pohlmann AR, Fonseca FN, Paese K, Detoni CB, Coradini K, Beck RC, Guterres SS. 2013. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 10: 623-638.
- Pointer KB, Clark PA, Zorniak M, Alrfaei BM, Kuo JS. 2014. Glioblastoma cancer stem cells: Biomarker and therapeutic advances. *Neurochem Int* 71: 1-7.
- Poletto F, Fiel L, Lopes M, Schaab G, Gomes A, Guterres S, Rossi-Bergmann B, Pohlmann A. 2012. Fluorescent-Labeled Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules: Synthesis, Physicochemical Properties and Macrophage Uptake. *Colloid Science and Biotechnology* 1: 89–98.
- Prados MD, et al. 2015. Toward precision medicine in glioblastoma: the promise and the challenges. *Neuro Oncol*.
- Preusser M, Haberler C, Hainfellner JA. 2006. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. *Wien Med Wochenschr* 156: 332-337.
- Riksen NP, Barrera P, van den Broek PH, van Riel PL, Smits P, Rongen GA. 2006. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans in vivo. *Ann Rheum Dis* 65: 465-470.
- Rincon-Arevalo H, Sanchez-Parra CC, Castano D, Yassin L, Vasquez G. 2015. Regulatory B Cells and Mechanisms. *Int Rev Immunol*.
- Rittiner JE, Korboukh I, Hull-Ryde EA, Jin J, Janzen WP, Frye SV, Zylka MJ. 2012. AMP is an adenosine A1 receptor agonist. *J Biol Chem* 287: 5301-5309.
- Robson SC, Seigny J, Zimmermann H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2: 409-430.
- Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K. 2005. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost* 31: 217-233.
- Rolle CE, Sengupta S, Lesniak MS. 2012. Mechanisms of immune evasion by gliomas. *Adv Exp Med Biol* 746: 53-76.
- Rosser EC, Mauri C. 2015. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity* 42: 607-612.
- Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, Doyle R, Bosma A, Carter NA, Harris KA, Jones SA, Klein N, Mauri C. 2014. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 production. *Nat Med* 20: 1334-1339.

Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. 2007. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer* 110: 13-24.

Sayour EJ, McLendon P, McLendon R, De Leon G, Reynolds R, Kresak J, Sampson JH, Mitchell DA. 2015. Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 64: 419-427.

Saze Z, Schuler PJ, Hong CS, Cheng D, Jackson EK, Whiteside TL. 2013. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood* 122: 9-18.

Scherer HJ. 1940. A Critical Review: The Pathology of Cerebral Gliomas. *J Neurol Psychiatry* 3: 147-177.

Serra S, et al. 2011. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood* 118: 6141-6152.

Shao J, Li X, Lu X, Jiang C, Hu Y, Li Q, You Y, Fu Z. 2009. Enhanced growth inhibition effect of resveratrol incorporated into biodegradable nanoparticles against glioma cells is mediated by the induction of intracellular reactive oxygen species levels. *Colloids Surf B Biointerfaces* 72: 40-47.

Sica A, Bronte V. 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 117: 1155-1166.

Singh CK, Ndiaye MA, Ahmad N. 2015. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochim Biophys Acta* 1852: 1178-1185.

Sitkovsky MV. 2009. T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response. *Trends Immunol* 30: 102-108.

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

Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. 2012. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today* 17: 160-166.

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86: 1065-1073.

Stagg J, Smyth MJ. 2010. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29: 5346-5358.

Stanic B, van de Veen W, Wirz OF, Ruckert B, Morita H, Sollner S, Akdis CA, Akdis M. 2014. IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol*.

Stupp R, et al. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996.

- Su Y, Huang X, Raskovalova T, Zacharia L, Lokshin A, Jackson E, Gorelik E. 2008. Cooperation of adenosine and prostaglandin E2 (PGE2) in amplification of cAMP-PKA signaling and immunosuppression. *Cancer Immunol Immunother* 57: 1611-1623.
- Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, Szade J, Czapiewski P, Biernat W, Zaczek A. 2012. CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 20: 103-107.
- Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5: 219-234.
- Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M. 2001. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med* 7: 1010-1015.
- Teskac K, Kristl J. 2010. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int J Pharm* 390: 61-69.
- Tohyama N, Tanaka S, Onda K, Sugiyama K, Hirano T. 2013. Influence of anticancer agents on cell survival, proliferation, and CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell-frequency in human peripheral-blood mononuclear cells activated by T cell-mitogen. *Int Immunopharmacol* 15: 160-166.
- Tseng SH, Lin SM, Chen JC, Su YH, Huang HY, Chen CK, Lin PY, Chen Y. 2004. Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clin Cancer Res* 10: 2190-2202.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60: 166-193.
- van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, Wesseling P, Wurdinger T, de Vries HE. 2015. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat*.
- 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.
- Vorhoff T, Zimmermann H, Pelletier J, Sevigny J, Braun N. 2005. Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signal* 1: 259-270.
- Watanabe K, Tachibana O, Sata 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: 217-223; discussion 223-214.
- Watters JJ, Schartner JM, Badie B. 2005. Microglia function in brain tumors. *J Neurosci Res* 81: 447-455.
- Wen PY, Kesari S. 2008. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359: 492-507.

- Wessels JAM, Huizinga TWJ, Guchelaar HJ. 2007. Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 47: 249-255.
- White N, Burnstock G. 2006. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 27: 211-217.
- Whitlock NC, Baek SJ. 2012. The anticancer effects of resveratrol: modulation of transcription factors. *Nutr Cancer* 64: 493-502.
- 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.
- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. 2003. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9: 606-612.
- Wolff JE, Kortmann RD, Wolff B, Pietsch T, Peters O, Schmid HJ, Rutkowski S, Warmuth-Metz M, Kramm C. 2011. High dose methotrexate for pediatric high grade glioma: results of the HIT-GBM-D pilot study. *J Neurooncol* 102: 433-442.
- Xu S, et al. 2013. Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro Oncol* 15: 1160-1172.
- Yegutkin GG. 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673-694.
- Yehudai D, Snir A, Peri R, Halasz K, Haj T, Odeh M, Kessel A. 2012. B cell-activating factor enhances interleukin-6 and interleukin-10 production by ODN-activated human B cells. *Scand J Immunol* 76: 371-377.
- Zhang W, Fei Z, Zhen HN, Zhang JN, Zhang X. 2007. Resveratrol inhibits cell growth and induces apoptosis of rat C6 glioma cells. *J Neurooncol* 81: 231-240.
- Zhao G-j, Lu Z-q, Tang L-m, Wu Z-s, Wang D-w, Zheng J-y, Qiu Q-m. 2012. Curcumin inhibits suppressive capacity of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in mice in vitro. *International Immunopharmacology* 14: 99-106.
- Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, Yin L, Shao Z, Ou Z. 2007. Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol Ther* 6: 426-431.
- Zimmermann H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309.
- Zunino SJ, Storms DH. 2015. Physiological levels of resveratrol metabolites are ineffective as anti-leukemia agents against Jurkat leukemia cells. *Nutr Cancer* 67: 266-274.