

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**MICROAMBIENTE TUMORAL: ESTUDO DO EFEITO DO
COCULTIVO DE ASTRÓCITOS E GLIOMA C6 NA
ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES E DA ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE INDUZIDA**

Carlus Augustu Tavares do Couto

Pelotas, 2013

Carlus Augustu Tavares do Couto

**MICROAMBIENTE TUMORAL: ESTUDO DO EFEITO DO COCULTIVO
DE ASTRÓCITOS E GLIOMA C6 NA ATIVIDADE DAS
ECTONUCLEOTIDASES E DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA**

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito
parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Profa. Elizandra Braganhol, Dra.

Orientadora de Estágio: Profa. Rosélia Maria Spanevello, Dra.

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C871m Couto, Carlus Augustu Tavares do
Microambiente tumoral: estudo do efeito do cocultivo de astrócitos e glioma C6 na atividade das ectonucleotidases e da óxido nítrico sintase induzida / Carlus Augustu Tavares do Couto. – 49f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2013. – Orientador Elizandra Braganhol.

1.Biotecnologia. 2.Ectonucleotidases. 3.Microambiente tumoral. 4.iNOS. 5.Glioma C6. 6.Cocultivo. I.Braganhol, Elizandra. II.Título.

Banca avaliadora:

Profa. Dra. Elizandra Braganhol (orientadora)

Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello

Profa. Dra. Giana Cognato

Dedico

aos meus pais, à minha irmã
e à todos os seres sencientes.

Agradecimentos

Mais importante que conquistar é ser grato àqueles que desempenharam papéis importantes no caminho para que os objetivos fossem alcançados, assim agradeço:

Aos meus pais, pelo apoio, ou pelo discordar silencioso, em todos os momentos importantes na minha vida. Por terem me tornado quem eu sou, tanto em conhecimento, quanto em motivação na vida.

À minha irmã, que sempre me apoiou, sempre me fez perceber que o mundo era maior do que eu podia ver, que a ciência de nada vale se não for para beneficiar. Por me ajudar a ser mais tolerante, menos irritado e mais amoroso (embora ainda em fase germinativa).

Aos meus familiares que sempre me apoiaram, estiveram perto nem que seja com um sorriso, ou longe com o pensamento direcionado para a minha vitória, avós, tios, tias, primos. Agradeço ainda aos meus padrinhos pelo carinho infinito.

Aos meus colegas de biotecnologia, cada um por seu papel fundamental na minha formação profissional, pelas discussões que nos caracterizaram, pela determinação e pela paciência por me acompanharem mesmo com todo o meu jeito difícil de ser. À Gabriela Debom por ter me indicado um novo caminho de pesquisa que têm me trazido muita alegria.

Aos meus amigos Del, Lucas, Hugo, Talita e Daniel por estarem sempre perto, pelas noites de música, pelas brigas fervorosas sobre ciência, vida, conhecimento, religião e tudo mais que se possa imaginar. Pelo suporte pra superar todas as fases difíceis ao longo do curso.

Aos meus professores, por terem me transmitido conhecimento, ou não, por terem me exemplificado como ser, ou não.

À minha ex-orientadora e amiga Dulce, por ter me ensinado, sobretudo, que a motivação é o item mais importante na pesquisa. Que disciplina, organização e conhecimento são fundamentais para o trabalho. Por todo conhecimento que de ti recebi e ainda vou receber, pelas conversas sobre “temas diversos” e por estar sempre disponível, por ter confiado em mim para desempenhar papéis importantes em alguns experimentos.

À minha orientadora Elizandra, pela confiança, pelo conhecimento, pela abertura a ideias, propostas, sugestões e projetos com seu tradicional “Táá!”. Por ter me oferecido momentos de muito desenvolvimento racional. Por estar sempre pronta para ajudar, escutar, conversar. Por contrapor meu péssimo humor com um sorriso no rosto e muita alegria, por contrapor minha negatividade com a certeza que as coisas vão funcionar, e por todo apoio ao longo desse e outros estudos.

À minha co-orientadora Rosélia, por estar disposta a ajudar, sempre pronta para responder sobre o “maldito purinérgico”, pelo sorriso sincero e por sempre me satisfazer as necessidades básicas de café.

Aos colegas de laboratório pelo suporte técnico ao longo dessa jornada, pelos momentos de alegria, e por serem quem são.

Às minhas crenças por tornarem tudo tolerável, tudo suportável e tudo justo. Aos que sempre estão comigo, me guiando, me ajudando a seguir o caminho que mais vai gerar benefícios, em especial ao Navaruna, meu pai, mestre, irmão e, acima de tudo, melhor amigo.

“Sim, minha força está na solidão. Não tenho medo nem de chuvas tempestivas nem das grandes ventanias soltas, pois eu também sou o escuro da noite.”

Clarice Lispector

Resumo

DOCOUTO, Carlus Augustu Tavares. **Microambiente tumoral: estudo do efeito do cocultivo de astrócitos e glioma C6 na atividade das ectonucleotidases e da óxido nítrico sintase induzida.** 2013. 49f. Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Glioblastoma multiforme, o glioma mais comumente diagnosticado e agressivo em adultos é caracterizado por células da glia neoplásicas pouco diferenciadas, com alto potencial invasivo e angiogênese. Além de células tumorais gliais, a existência de um microambiente favorável está relacionada com o aumento de malignidade, a indução da proliferação e o desenvolvimento de células quimioresistentes. Aumento da atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e mudanças na sinalização purinérgica têm sido relatados como fatores que modulam o microambiente tumoral. Este trabalho tem como objetivo avaliar o metabolismo do ATP extracelular em astrócitos expostos a meio condicionado de glioma C6 (CM-C6) ou sob cocultivo direto de astrócitos e glioma C6. Astrócitos corticais foram cultivadas de acordo com o protocolo descrito por Gottfried (1999). Após a maturação das células, os astrócitos foram tratados com CM-C6 ou submetido a cocultura com C6 durante 24 horas e 48 horas, respectivamente. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido para a avaliação da atividade da iNOS via método de Greiss e a atividade das ectonucleotidases foi avaliada pelo método de verde de malaquita. A exposição dos astrócitos com o CM-C6 aumentou em 4,0 vezes a hidrólise de ADP, enquanto não foi observado alteração significativa na hidrólise do ATP e do AMP, quando comparados ao grupo controle. Do mesmo modo, a hidrólise de ATP e AMP foi aumentada em 2,3 e 1,4 vezes, respectivamente, em condições de cocultura C6-astrócitos, quando comparado com os astrócitos ou glioma C6 cultivados isoladamente. Além disso, cocultura de C6-astrócitos induziu o aumento da atividade da iNOS em 12,38 vezes. Estes resultados suportam a relação entre glioma e astrócitos, sugerindo indução de malignidade via estimulação da atividade da iNOS e supressão imune no tumor pela geração de adenosina no microambiente tumoral .

Palavras-chave: Astrócitos. Glioma C6. iNOS. Ectonucleotidases. Sinalização Purinérgica.

Abstract

DOCOUTO, Carlus Augustu Tavares. **Tumor microenvironment: study of the effect of co-culture of astrocytes and C6 glioma in the activity of ectonucleotidases and induced nitric oxide synthase.** 2013. 49f. Completion of course work, Bachelor Degree course in Biotechnology. Federal University of Pelotas. Pelotas, RS, Brazil.

Glioblastoma multiform, the most commonly diagnosed and aggressive glioma in adults is characterized by neoplastic astrocytes poorly differentiated with high invasive potential and angiogenesis. In addition to glial tumor cells, the existence of a favorable microenvironment is related to increased malignancy, cell proliferation induction and chemoresistance development. Increased activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and changes in purinergic signaling have been reported as factors that modulate the tumor microenvironment. This work aims to evaluate the metabolism of extracellular ATP in astrocytes exposed to C6 glioma-conditioned medium (C6-CM) or under C6-astrocyte co-culture conditions. Cortical astrocytes were cultured according to the protocol described by Gottfried (1999). After cell maturation, astrocytes were treated with C6-CM or submitted to C6-astrocyte co-culture for 24h and 48h, respectively. After this period, the supernatant was collected for iNOS activity measurement via Greiss reagent and ectonucleotidase activity was evaluated by malachite green method. The exposition of astrocytes to C6-CM increased by 4 times ADP hydrolysis, when compared to controls. Similarly, the ATP and AMP hydrolysis was increased by 2.3 and 1.4 times, respectively, in C6-astrocyte co-culture conditions, when compared to astrocytes or C6 glioma cultivated alone. In addition, C6-astrocyte co-culture induced 12.38 times increases of iNOS activity. These results support a relationship between glioma and astrocyte, suggesting induction of malignancy via iNOS activity stimulation and tumor immune suppression by adenosine generation in the tumor microenvironment.

Keywords: Astrocytes. C6 glioma. iNOS. Ectonucleotidases. Purinergic signaling.

Sumário

1.	Introdução	12
2.	Objetivos.....	14
2.1.	Objetivo Geral.....	14
2.2.	Objetivos específicos	14
3.	Revisão de literatura	15
3.1.	Gliomas.....	15
3.1.1.	Teorias sobre a origem dos gliomas	15
3.1.2.	Classificação dos gliomas.....	15
3.1.2.1	Quanto ao tipo celular	16
3.1.2.2.	Quanto a localização	16
3.1.2.3.	Estadiamento quanto a malignidade	16
3.1.3.	Glioblastoma multiforme (GBM).....	17
3.1.4.	Tratamento dos gliomas	18
3.2.	Microambiente tumoral	18
3.3.	Astrócitos	19
3.4.	Sistema purinérgico.....	21
3.4.1.	Purinoreceptores.....	21
3.4.2.	Ectonucleotidases.....	22
3.5.	Óxido Nítrico Sintase Induzida.....	24
3.6.	Hipótese do trabalho.....	26
4.	Materiais e Métodos	28
4.1.	Cultivo da linhagem de glioma C6	28
4.2.	Cultivo de astrócitos	28
4.3.	Obtenção do meio condicionado de glioma C6 (CM-C6).....	29
4.4.	Cocultivos (direto e CM-C6)	29
4.5.	Determinação da hidrólise de nucleotídeos.....	29
4.6.	Determinação da atividade da iNOS	30

4.7. Determinação da proteína	30
4.8. Análise estatística	31
5. Resultados.....	32
5.1. Análise da hidrólise de ATP, ADP e AMP em cultura de astrócitos cocultivados com glioma C6 ou expostos ao meio condicionado de glioma C6.	32
5.2. Análise da atividade da iNOS em cultura de astrócitos cocultivados com glioma C6 ou expostos ao meio condicionado de glioma C6.....	35
6. Discussão	37
7. Conclusão.....	40
Referências Bibliográficas	41

1. Introdução

Os gliomas são os tumores cerebrais primários mais comuns (Maher e Raffel, 2004), correspondendo a mais de 50% das neoplasias que acometem o do sistema nervoso central (SNC) (Preusser et al., 2006; Yin et al., 2007; Dunn et al., 2007). Esse tipo tumoral é caracterizado por uma grande variedade clínica e histológica, sendo as principais causas de falência do tratamento e de baixas taxas de sobrevida para os pacientes (Stupp, 2005).

Os gliomas são classificados em uma escala de quatro níveis crescentes de malignidade (Dai e Holland, 2001). Sendo assim, os gliomas enquadrados dentro dos níveis I e II são definidos como tumores de baixa malignidade, enquanto os tumores enquadrados nos níveis III e IV são classificados como tumores de elevada malignidade. Tumores de baixa malignidade podem ser definidos como neoplasias com baixa proliferação celular e limitada capacidade de invadir o parênquima cerebral (Stieber, 2001). Já os gliomas de alta malignidade são caracterizados por alta proliferação celular, anaplastia (desdiferenciação celular) e pleomorfismo celular, sendo essas características relacionadas a aumento de agressividade (Behin et al., 2003). Dessa forma, pacientes diagnosticados com gliomas de alto grau apresentam um péssimo prognóstico (Stupp, 2005).

Entretanto, apenas um conjunto celular característico de uma formação tumoral não é fundamental para o estabelecimento de gliomas de alto grau de malignidade e invasão. Dessa forma é necessário um microambiente tumoral inflamatório, que propicia a proliferação celular e o aumento da massa celular, sendo que mais de metade da massa tumoral se dá pela presença de células do infiltrado inflamatório (Skog et al, 2008). Esse infiltrado é fundamental na manutenção das condições essenciais para o crescimento tumoral (Skog et al, 2008). Dentre as vias bioquímicas alteradas nesse microambiente estão incluídas o sistema purinérgico e a indução da expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Takano et al, 2001). Numa tentativa de reproduzir *in vitro* as comunicações celulares presentes no sítio do glioma, diversos protocolos vem sendo desenvolvidos, dentre os quais se destacam os cocultivos de células tumorais com células normais, tanto de forma direta quanto indireta, e os tratamentos cruzados com meios condicionados do tipo

celular oposto. Essa comunicação direta, cocultivo direto, vêm sendo indicada como moduladora de fatores de indução e aumento de malignidade tumoral. Apesar das células da glia, particularmente os astrócitos, consistirem na maior população celular do SNC, pouco ainda é conhecido sobre a interação glioma – astrócito e as consequências disso sobre a progressão tumoral. Um melhor entendimento da comunicação entre gliomas e astrócitos poderá dar respostas sobre a estratégia utilizada pelas células tumorais para infiltrar no parênquima cerebral e resistir ao tratamento quimioterápico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi analisar o perfil das ectonucleotidases e da iNOS em culturas de astrócitos expostas ao meio condicionado de glioma ou cocultivadas com glioma C6.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o efeito do cocultivo e tratamento com meio condicionado de glioma C6 sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) em cultura de astrócitos;

- Investigar o efeito do cocultivo e tratamento com meio condicionado de glioma C6 sobre a atividade da iNOS em cultura de astrócitos;

3. Revisão de literatura

3.1. Gliomas

3.1.1. Teorias sobre a origem dos gliomas

Atualmente são descritas duas teorias que embasam possíveis condições de formação dos gliomas. Uma delas, mais antiga, defende que os gliomas são formados por células gliais maduras, da mesma forma que os astrócitos e os oligodendrócitos, e que estariam sujeitas a mutações genéticas em oncogenes, e dessa forma se desencadearia o processo de formação tumoral (Lipton e Rosenber, 1994; Paulus e Tonn, 1995). A segunda dessas teorias defende que os gliomas são originados de células progenitoras neurais que sofreram mutação e consequente transformação oncogênica, dessa forma tornando-se células iniciadoras tumorais (Singh et al., 2004; Piccirillo e Vescovi et al., 2007; Piccirillo et al., 2009). Assim sendo, as células tronco neurais estão sujeitas as mesmas vias de sinalização envolvidas no avanço dos tumores gliais. Além disso, elas apresentam alta motilidade, capacidade de associação a vasos sanguíneos, marcadores típicos de células tronco (CD133) e ativação de vias de proliferação celular, sendo todas esses fatores características de células de gliomas (Palmer et al., 2000). Essa segunda teoria ainda possibilita a explicação da formação de tumores com diferentes tipos celulares neurais, como os oligoastrocitomas, já que as células tronco tumorais manteriam a capacidade de diferenciação, embora que esta seja limitada e alterada, em comparação às células tronco neurais saudáveis (Sanai et al., 2005).

3.1.2. Classificação dos gliomas

Em 2007 a OMS lançou um protocolo de identificação e classificação de gliomas, centrado na identificação de três fatores: o tipo celular, a localização e o grau de malignidade do tumor. Tais procedimentos são atualmente a forma tradicional para estabelecimento de condutas para tratamento, que são basicamente de três categorias clínicas: remoção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, sendo esses tratamentos isolados ou em combinação (Louis et al., 2007).

3.1.2.1. Quanto ao tipo celular

Para o estabelecimento de uma identificação dos tipos celulares presentes no tumor são executados dois procedimentos padrões: análise histológica e análise de marcadores celulares. Na análise histológica é efetuada uma comparação entre os tipos celulares presentes no glioma com tipos celulares gliais saudáveis, ou seja, astrócitos, células ependimais e oligodendrócitos, de forma a se estabelecer similaridades entre as células. Já nas análises baseadas em marcadores podem ser destacadas as análises imunológicas, onde os tecidos tumorais são tratados com anticorpos específicos para determinadas proteínas características de determinado tipo celular, e os procedimentos moleculares de identificação de padrões de expressão gênica característicos de tipos específicos celulares.

As análises supracitadas levam a determinação dos tumores em três sub-tipos específicos de gliomas: astrocitomas (formados por astrócitos neoplásicos), oligodendrogliomas (formados por oligodendrócitos neoplásicos) e gliomas mistos (formados por astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais neoplásicos).

3.1.2.2. Quanto a localização

Com relação a localização cerebral, os gliomas podem ser classificados em infra-tentoriais ou supra-tentoriais. Os gliomas infra-tentoriais são localizados abaixo do tentorium (membrana que limita o cerebelo e o cérebro), enquanto que os supra-tentoriais são localizados acima do tentorium. Gliomas supra-tentoriais são predominantes em adultos, enquanto gliomas infra-tentoriais são predominantes em crianças (Vougioukas et al., 2005; Kaloshi et al., 2009).

3.1.2.3. Estadiamento quanto a malignidade

Nessa etapa de classificação do glioma são analisados, principalmente, três fatores: capacidade invasiva, malignidade celular e potencial para entrar em necrose. A OMS observa a classificação dos gliomas em quatro níveis crescentes de malignidade, de I a IV (Chintala et al., 1999).

Pacientes diagnosticados com gliomas de grau I possuem altos índices de cura e seu tratamento é efetuado com base na remoção cirúrgica, não necessitando administração de quimioterápicos por possuírem baixos índices de proliferação celular e pouco crescimento, são majoritariamente identificados em crianças e adolescentes (Stieber, 2001). Gliomas identificados como de grau II são tumores de crescimento lento, assim como os de grau I, entretanto que já se infiltraram no tecido adjacente, seu tratamento se baseia na remoção cirúrgica podendo reincidir após a remoção. Também é sabido que alguns gliomas diagnosticados como de grau II podem evoluir para tumores de maior malignidade (Van den Bent, 2007). Os gliomas de baixo grau de malignidade não são considerados tumores benignos mas oferecem para o paciente um melhor prognóstico que os tumores de grau mais elevado pois os índices de resposta ao tratamento e cura são significativamente maiores que nos tumores de graus III e IV (Bromberg e Van den Bent, 2009).

Os tumores que apresentam características de anaplasia (desdiferenciação celular), altos índices de proliferação celular e pleomorfismo celular constituem os gliomas de graus elevados de malignidade que são enquadrados nos graus III e IV segundo a OMS (Behin et al., 2003), sendo o prognóstico desses tumores altamente desfavorável. Gliomas de grau III são identificados por características histológicas de malignidade e alto índice mitótico, de forma que rapidamente pode evoluir para um glioma de grau IV ou glioblastoma multiforme (GBM). Tal tipo de tumor, o GBM, é o glioma mais agressivo e letal e mais comumente diagnosticado correspondendo a 70% dos gliomas de alto grau de malignidade identificados (Kanu et al., 2009; Vredenburgh et al., 2009).

3.1.3. Glioblastoma multiforme (GBM)

O GBM apresenta, geralmente, crescimento multifocal e elevada invasividade (Dai e Holland, 2001), sendo o tumor cerebral primário mais devastador e também o mais comumente diagnosticado. Tais tumores apresentam células histologicamente pouco diferenciadas, áreas de necrose, pseudopaliçada periférica e/ou proliferação vascular (Sathornusumetee et al., 2008), além de possuírem descontrole da proliferação celular, infiltração difusa

no parênquima cerebral, alta resistência a apoptose e elevada instabilidade genômica (Laws e Shaffrey, 1999). O crescimento multifocal já citado, é caracterizado pela presença de várias lesões ao longo do tecido sadio, de forma que inviabiliza a remoção cirúrgica dos tumores, além de incrementar sua capacidade de infiltrar o parênquima cerebral (Stupp et al., 2007). Tais características ainda levam a um crescimento rápido e a altos índices de recorrência (Stupp et al., 2006; Yin et al., 2007).

O tecido cerebral no entorno do GBM apresenta uma resposta inflamatória, constituída de ativação de macrófagos, astrogliose reativa, invasão vascular e formação de edema (Balassiano et al., 2006).

3.1.4. Tratamento dos gliomas

O tratamento dos gliomas envolve três aspectos: ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia (Sathornsumetee e Rich, 2008). Em se tratando de gliomas altamente infiltrativos a ressecção cirúrgica não se mostra tão eficaz já que na maioria dos casos o tumor é multifocalizado. Entretanto novas tecnologias vem otimizando os processos cirúrgicos possibilitando maior sucesso na remoção de grande parte dos focos tumorais. A radioterapia é a técnica mais efetiva no tratamento dos gliomas, aumentando a sobrevida dos pacientes de 3 a 7 para 8 a 12 meses (Asthagiri et al., 2007).

Concomitantemente ou posteriormente à radioterapia, a quimioterapia com temozolamida (Temodal®) tem se mostrado eficaz em aumentar a sobrevida dos pacientes para 12,1 a 14 meses (Stupp et al., 2005). A temozolamida é um agente alquilante que ultrapassa a barreira hematoencefálica agindo, dessa forma, no ambiente cerebral (Sathornsumetee e Rich, 2008). É sabido também que a obtenção de fármacos para o tratamento dos gliomas e demais tumores cerebrais é dificultado pela limitação imposta pela barreira hematoencefálica (Brandes et al., 2000).

3.2. Microambiente tumoral

Sabe-se que diversas alterações genéticas estão presentes nas neoplasias, alterações essas que envolvem genes de supressão tumoral, de controle do ciclo celular ou até mutações nos chamados proto-oncogenes.

Entretanto, tais mutações não são capazes de, por si, estabelecerem tumores de alta malignidade. Sabe-se que há um complexo espaço que possibilita o estabelecimento bem como a manutenção desses tumores, o chamado microambiente tumoral (Skog et al., 2008).

Células tumorais são capazes de liberar exossomos contendo grande quantidade de mRNAs e de microRNAs. Essas vesículas se difundem pelo ambiente tumoral e podem manipular funções vitais de forma a proporcionar vantagens para o tumor. Um exemplo desse mecanismo de comunicação são os exossomos liberados por gliomas contendo mRNA de fatores pró-angiogênicos, favorecendo a neovascularização da massa tumoral (Skog et al., 2008). Essa comunicação com as células adjacentes pode se dar em diversas vias, como liberação de citocinas, ou comunicação direta via contato celular. Diversos estudos estabelecem que alterações no sistema purinérgico e na atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) participam no desenvolvimento de tumores originários de células gliais (Skog et al., 2008).

As características das células tumorais também influenciam na formação de um microambiente favorável como, por exemplo, gliomas que tem capacidade de liberar glutamato apresentam uma vantagem proliferativa quando comparados a gliomas que não liberam tal neurotransmissor (Takano et al., 2001)

3.3. Astrócitos

Células gliais, derivadas dos precursores neurais, que mesmo descobertas no século XIX foram mantidas à margem da neurociência até pouco mais de 50 anos atrás, quando finalmente foram percebidas funções importantes para o funcionamento cerebral além do simples suporte neuronal (Privat et al., 1995).. Atualmente sabe-se que, além de ser o tipo celular que apresenta maior variabilidade funcional na bioquímica cerebral, os astrócitos ainda são dotados de grande plasticidade celular ao longo da vida (Shao e McCarthy, 1994). Os astrócitos compõem 50% do volume cerebral e constituem 90% do número total de células cerebrais (Privat et al., 1995).

Os astrócitos possuem essa denominação devido ao seu aspecto semelhante à uma estrela, sendo classificados em três categorias: astrócitos fibrosos, astrócitos protoplasmáticos e astrócitos mistos. Os astrócitos fibrosos são encontrados na região branca do cérebro, os astrócitos protoplasmáticos são encontrados na região cinzenta do cérebro em contato com o corpo neuronal, as sinapses e os dendritos (Kimelberg e Norenberg, 1989). Os astrócitos mistos são raramente encontrados e se localizam em regiões entre a massa branca e a massa cinzenta, assim apresentam características de ambos os fenótipos (Privat et al., 1995).

Os astrócitos são componentes fundamentais na formação das sinapses, principalmente em regiões glutamatérgicas, uma vez que essas células são responsáveis pela retirada do glutamato da fenda sináptica e pelo controle dos níveis desse sinalizador potencialmente neurotóxico (Shao e McCarthy, 1994). Para tanto, os astrócitos possuem em sua membrana transportadores de glutamato e em seu citosol apresentam a enzima glutamina sintetase (único tipo celular do SNC com expressão dessa enzima) (Kimelberg, 1985). Diversas células apresentam características de astrócitos em diferentes locais, como a glia de Bergmann encontrada no cerebelo, os pituitócitos na glândula pituitária e a glia de Müller na retina (Shao e McCarthy, 1994).

Além da sua fundamental ação no controle da toxicidade glutamatérgica, os astrócitos ainda desempenham outros papéis importantes no desenvolvimento das funções cerebrais, incluindo: formação das fibras para o fluxo dos neurônios no desenvolvimento embrionário (glia radial); fornecimento de fatores tróficos para o desenvolvimento das sinapses; fornecimento de energia devido ao estoque de glicogênio; manutenção da atividade excitatória neuronal mantendo os níveis de íons extracelulares; atuação na resposta imune cerebral; participação da formação da barreira hematoencefálica e formação de cicatrizes em casos de injúria cerebral (astrogliose reativa) (Shao e McCarthy, 1994).

Os astrócitos também participam da liberação de glutamato e de outros neurotransmissores no modelo de sinapse tripartida. Essa liberação é modulada pelos níveis de Ca^{2+} no interior dos astrócitos. Para confirmar essa

teoria foram realizados dois tipos de experimento. Em um primeiro momento foram realizadas em cultivos primários de astrócitos, onde foram utilizados ligantes que estimulam o influxo de cálcio nos astrócitos, o que resultou na liberação de aminoácidos excitatórios como o glutamato e o aspartato. Para confirmar se a liberação desses neurotransmissores também se dá *in vivo*, foram realizados novos experimentos onde fatias de hipocampo de ratos foram tratados com toxina tetânica, para a qual os astrócitos possuem poucos ligantes, e foi observada a liberação do glutamato. Ainda não se sabe se os astrócitos também liberam glutamina ou outros tipos de gliotransmissores nessas estruturas sinápticas (Haydon, 2001).

É importante ressaltar a importância que os astrócitos vêm tomando nas neurociências, sendo agora visto e compreendido como uma célula complexa, fundamental em diversos fatores, até na liberação de transmissores nas sinapses, fundamentando as ditas sinapses tripartidas. Nessas estruturas os astrócitos liberam os chamados gliotransmissores, classe de transmissores químicos que atualmente engloba glutamato, aspartato, D-serina e ATP (Haydon, 2001).

3.4. Sistema purinérgico

Foi estabelecido o conceito de transmissão purinérgica em 1972 quando Burnstock demonstrou que o ATP protagonizava o que ele chamou de neurotransmissão não adrenérgica e não colinérgica (NANC). Posteriormente, em 1976, Burnstock ainda demonstrou que a sinalização purinérgica estava presente tanto no sistema simpático quanto parasimpático e atualmente está bem consolidada a idéia a presença desse sistema tanto no sistema nervoso central quanto periférico. Sabe-se que o sistema purinérgico é um sistema altamente complexo, presente em todos os processos tanto fisiológicos quanto patofisiológicos através da sensibilização dos chamados purinoreceptores e do controle dessa sensibilização por enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, as ectonucleotidases (Burnstock 2008).

3.4.1. Purinoreceptores

Após a liberação dos nucleotídeos e/ou nucleosídeos para o meio extracelular é necessário que eles sensibilizem receptores específicos, os purinoreceptores, para dar continuidade à cascata de sinalização purinérgica. Dessa forma, essas moléculas sinalizadoras podem atuar em dois tipos de receptores: P1 e P2, os quais são posteriormente subdivididos em P2X e P2Y. Os receptores do tipo P1 são sensibilizados por adenosina (ADO), os receptores P2X por ATP e os receptores P2Y podem ser sensibilizados tanto por ATP quanto por ADP (Burnstock 2008).

Os receptores do tipo P1, sensibilizados por ADO, são receptores exclusivamente metabotrópicos que são divididos em quatro sub-tipos de acordo com a afinidade pelo agonista: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 .

Já os receptores P2X são receptores ativados exclusivamente pelo ATP e são ionotrópicos, ou seja, ligados a canais iônicos, apresentam permeabilidade para íons Na^+ , K^+ e Ca^{+2} , dessa forma executam respostas celulares rápidas. Os receptores P2X são classificados em sete sub-tipos ($P2X_{1-7}$) de acordo com a afinidade que apresentam pelo ligante, ATP (Abbracchio, 2006).

Os receptores P2Y por sua vez, são receptores metabotrópicos, acoplados à proteína G, e podem ser sensibilizados por diversos nucleotídeos, ATP, ADP, UTP e UDP, e são responsáveis por mediar as respostas celulares de longa duração, estando, dessa forma, envolvidos em processos tróficos e no desenvolvimento celular. Estes receptores são divididos em oito sub-tipos ($P2Y_{1,2,4,6,11-14}$) (Abbracchio, 2006).

3.4.2. Ectonucleotidases

As ectonucleotidases compõem um grupo de enzimas que atua como um potente gerenciador da sinalização purinérgica hidrolisando nucleotídeos até seus respectivos nucleosídeos (ex.: ATP até ADO) no meio extracelular. Nessa família de enzimas estão incluídas as ecto-nucleosídeo-trifosfodifosfohidrolases (E-NTPDases), as ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs), e a ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73) (Robson et al., 2006; Zimmermann, 2001). Essas ectoenzimas

formam um rigoroso centro de controle da concentração dos nucleosídeos extracelulares bem como do tempo de exposição e disponibilidade deles aos seus receptores (Zimmermann, 2001).

As E-NTPDases são enzimas que hidrolisam ATP a ADP e ADP a AMP, além de outros nucleosídeos tri- e difosfatados. Esse subgrupo possui como características comuns a presença de cinco sítios conservados em sua estrutura, denominados de Regiões Conservadas da Apirase, a necessidade de cofatores enzimáticos cátions divalentes (Mg^{+2} e Ca^{+2}), a insensibilidade a inibidores de outras ATPases e atividade enzimática ótima em pH alcalino. Essas enzimas são de difícil extração e purificação por se tratarem de glicoproteínas e apresentarem dois domínios transmembrana. Em mamíferos foram clonados e caracterizados oito membros pertencentes a família das NTPDases (NTPDase1-8), sendo que apenas as NTPDases1-3 e 8 estão presentes na membrana celular, apresentando as porções C e N-terminal para o meio intracelular enquanto as suas regiões catalíticas estão expostas para o meio extracelular (Robson et al, 2006).

A NTPDase1 metaboliza igualmente bem o ATP e o ADP, apresentando uma relação de hidrólise 1:1. A NTPDase1 está amplamente expressa no endotélio vascular, em plaquetas, neutrófilos e linfócitos, sendo essencial para a manutenção do tônus vascular, do controle da ativação plaquetária e da resposta imune (Robson et al, 2006). Já a NTPDase2 hidrolisa preferencialmente o ATP, apresentando uma relação de hidrólise de 30:1, ou seja, 30 ATPs para 1 ADP. Devido a sua preferência pelo substrato ATP a NTPDase2 leva a um acúmulo de ADP no meio extracelular e está altamente expressa nas células da musculatura lisa, participando do controle do tônus vascular e da agregação plaquetária, e em células tronco presentes no sistema nervoso central, regulando a neurogênese (Robson et al, 2006). Alguns estudos indicam que as NTPDase3 e 8 apresentam uma preferência de substrato intermediária, metabolizando o ATP e o ADP em uma relação 3:1, em semelhança com a NTPDase1 (Bigonnesse et al. 2004; Chadwick and Frischauf 1998; Heine et al. 1999; Kaczmarek et al. 1996; Kegel et al. 1997).

As E-NPPs são enzimas que hidrolisam ligações pirofosfato ou fosfodiéster de vários componentes extracelulares, compondo um grupo de sete enzimas, das quais apenas três, as E-NPP1-3, são capazes de hidrolisar nucleotídeos no meio extracelular e, portanto, são as únicas de interesse na sinalização purinérgica (Stefan et al., 2005; Goding et al., 2003). A NPP-1 foi descoberta em linfócitos B (Takahashi et al. 1970) e posteriormente foi identificada em diversos tecidos, não sendo encontrada em neurônios ou células gliais mas, curiosamente, ela é expressa em células de glioma C6 de rato (Grobben et al. 1999). A NPP-2, outro membro desse grupo de enzimas, está presente nas células gliais de cerebelo de rato (Goding et al. 2003) e está relacionada com a formação de mielina pelos oligodendrócitos (Fuss et al. 1997). O último membro desse grupo de enzimas capaz de hidrolisar nucleotídeos é a NPP-3 que está presente na membrana dos precursores gliais e sua expressão é fundamental para a manutenção dessas células nesse estado de diferenciação (Blass-Kampmann et al. 1997).

Atualmente são conhecidas sete enzimas da família ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73) em humanos, cinco delas localizadas no citoplasma, uma na matriz mitocondrial e uma ancorada a membrana plasmática. Esta, por sua vez, atua hidrolisando o AMP até adenosina, sendo a principal enzima na via de degradação dos nucleotídeos e a maior fonte enzimática de adenosina no meio extracelular (Zimmermann, 1992). O controle de sua atividade catalítica é fundamental para a manutenção dos níveis extracelulares de adenosina e consequentes efeitos mediados pela sensibilização dos receptores do tipo P1.

3.5. Óxido Nítrico Sintase Induzida

O óxido nítrico (NO) é um composto de vida curta, que se difunde rapidamente pelos tecidos e que exerce diversas funções no organismo, agindo em diferentes tipos celulares astrócitos, macrófagos e células endoteliais (Yang et al., 2002). Esse efeito pleiotrópico permite que esse sinalizador atue na vasodilatação, neurotransmissão e citotoxicidade de macrófagos (Kim et al., 2013; Yang et al., 2002). Em condições patológicas, ele ainda apresenta atividade na morte de bactérias e na degeneração neuronal (Yang et al., 2002).

No sistema SNC, a produção de NO está associada às funções cognitivas, sua rota sugere que ele age induzindo e mantendo a plasticidade sináptica para o controle do sono, apetite, temperatura corporal e neurosecreção (Yang et al., 2002).

O NO é sintetizado através das óxido nítrico sintases (NOS), que sintetizam L-citrulina a partir de L-arginina e oxigênio. Sabe-se da existência de três diferentes formas da NOS: NOS neuronal (nNOS), NOS epitelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS) (Kim et al., 2013; Yang et al., 2002; Bakshi et al., 1998), tais enzimas não são isoformas, uma vez que são codificadas por genes diferentes (Bakshi et al., 1998). A iNOS é traduzida essencialmente quando há estímulo para isso. Esses estímulos são, geralmente, de natureza inflamatória tais como citocinas e/ou endotoxinas que levam a uma produção massiva de NO (Xie et al., 1992). Em contra partida, as demais NOS, endotelial e neuronal, são expressas constitutivamente de forma a propiciar a manutenção dos níveis basais de NO e satisfazer, dessa forma, as necessidades fisiológicas desse composto (Bredt e Snyder, 1990; Förstermann et al., 1991).

Outro aspecto discriminador da iNOS com a nNOS e a eNOS é o fato de que os monômeros desta se ligam fortemente à calmodulina, de forma que a atividade da iNOS é pouco dependente da concentração citoplasmática de cálcio (Xie et al., 1992), enquanto que a atividade das outras duas NOS é diretamente dependente dos níveis de cálcio/calmodulina intracelulares (Schmidt et al., 1992).

Estudos em diversos modelos de doença apontam que NO produzido por ação da iNOS pode apresentar tanto atividade citoprotetora (Tzeng et al., 1997; Zhao et al., 1998) quanto citotóxica (Kurose et al., 1996; Hsu et al., 1997), dependendo dos parâmetros do estudo e do tipo celular envolvido nas análises.

NO se mostra como agente tumoricida tanto *in vitro* como *in vivo*. Entretanto, ao mesmo tempo, esse sinalizador favorece a neovascularização e a invasividade tumoral, agindo desfavoravelmente na melhora do quadro dos pacientes (Stuehr e Nathan, 1989; FARIAS-EISNER et al., 1994; Andrade et al., 1992). Aspectos específicos do tipo celular podem ser vistos em análises

de transfecção de linhagens celulares como a K-1735 (melanoma de murino) e DLD-1 (carcinoma de cólon) com o gene da iNOS e nessas linhagens foram observados efeitos opostos, na linhagem K-1735 foi percebido um aumento nos índices de apoptose (Xie et al., 1995) enquanto que na linhagem DLD-1 foi percebido um aumento na agressividade e vascularização tumorais (Cullis et al., 2006).

3.6. Hipótese do trabalho

Tendo em vista que os gliomas são tumores fundamentalmente dependentes de um microambiente favorável para sua manutenção e desenvolvimento, torna-se extremamente relevante estabelecer novos protocolos para mimetizar esse ambiente, de forma a simular *in vitro* aspectos fundamentais da fisiopatologia da doença. Sabendo-se a importância do microambiente, uma das possibilidades são as técnicas de cocultivo celular e de utilização de meios condicionados para o tratamento de células.

Pensando especificamente em gliomas, diversos tipos celulares presentes no microambiente tumoral como células imunes e gliais podem ser vistos como alvo para este estudo. Nesse contexto, o cocultivo de gliomas com astrócitos se mostra de grande valia, uma vez que este é o tipo celular mais abrangente no córtex cerebral, lugar majoritário no surgimento do GBM. Assim, com o objetivo de analisar a interação entre células de glioma e astrócitos, duas vias de sinalização neurológica, uma envolvendo neurotransmissão e outra envolvendo neuromodulação podem ser estudadas, sinalização purinérgica e a atividade da iNOS, respectivamente. Tais parâmetros são fundamentais para um estudo aprofundado do microambiente, já que estão descritos na literatura tanto a seus aspectos fisiológicos quanto em seus aspectos patológicos, tanto de astrócitos quanto de gliomas, e outras células e doenças do sistema nervoso central. Apesar de sua presença na literatura, não há estudos na literatura que avaliem essas vias de sinalização, que estão envolvidas em processos de aumento na malignidade tumoral, em estudos de microambiente envolvendo cocultivo de astrócitos e células de glioma.

Sabe-se que a catabolização purinérgica está completamente alterada em células de gliomas C6 de rato, quando avaliada *in vitro*, ao se comparar com células análogas normais, os astrócitos, devido ao fato dessas células apresentarem alta expressão da NTPDase2, favorecendo a hidrólise de ATP e levando a um acúmulo de ADP, enquanto nos gliomas essa forte expressão não é encontrada, havendo, assim, baixos índices de hidrólise de nucleotídeos tri- e difosfatados, favorecendo a neurotoxicidade do ATP nas células normais (Wink et al, 2003). Esses eventos são de suma importância já que a presença do ATP na fenda sináptica pode levar a um aumento na liberação de glutamato e GABA no ambiente pré-sináptico ou uma diminuição, dependendo dos receptores ativados (Burnstock, 2008).

Em se tratando da importância do microambiente na expressão da iNOS, o aumento da atividade dessa enzima resulta em aumento do NO no sistema nervoso central, e esta molécula está envolvida em diversos fatores neurodegenerativos e neuromodulatórios. Quando em altos níveis, o NO leva a um aumento da expressão de fatores pró-inflamatórios (Calabrese, 2007; Kostourou, 2011). Essa situação ainda fica mais complexa quando sua presença se dá em condições de estresse oxidativo, com aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente ânion superóxido, havendo a formação de peroxinitrito (Calabrese, 2007). Ainda, quando em condições de estresse nitrosativo, o NO leva a um aumento na atividade das enzimas ciclooxigenases (COX), de cujas reações resultam inevitavelmente radicais livres, tornando ainda mais grave o quadro de neuroinflamação (Kostourou, 2011).

Dessa forma se mostra urgente um estudo para visualizar a comunicação cruzada que acontece entre astrócitos e gliomas para aumentar nosso conhecimento sobre os gliomas, novas formas de contenção da progressão tumoral e análise de diversos fatores inflamatórios envolvidos no estabelecimento e na progressão dos gliomas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultivo da linhagem de glioma C6

A linhagem de glioma de rato C6 foi obtida da ATCC e cultivadas conforme descrito a seguir. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (pH 7,4). As células foram mantidas sob condições padrão de cultivo em incubadora a 5% CO₂, 37°C e atmosfera umidificada.

4.2. Cultivo de astrócitos

Ratos neonatos de um a dois dias foram obtidos do Biotério Central da UFPel, eutanasiados por decapitação e o cérebro foi isolado e mantido em CMF (solução tampão livre de cálcio e magnésio) gelado para manutenção das estruturas. Posteriormente o córtex foi isolado e as meninges e os vasos sanguíneos foram removidos a fim de evitar contaminação da cultura com outros tipos celulares, como os fibroblastos. Uma vez isolados, os córtex foram dissociados mecanicamente por pipetagem contínua até não se observar grumos de tecido. Esse “pool” de células foi centrifugado a 1000 g por 10 min, o CMF foi retirado e o “pellet” de células foi ressuscitado em DMEM suplementado com 10% SFB (pH 7,6). As células foram contadas em microscópio ótico com o uso de câmara de Neubauer. Os astrócitos foram semeados em uma densidade de 2×10^5 células por poço em placas de 24 poços previamente preparadas com poli-L-lisina. As placas foram mantidas em incubadora de CO₂ por 4 horas, após tal período foi efetivada a primeira troca de meio, com objetivo de retirar restos de tecido e células que não aderiram. Após tais procedimentos as trocas de meio foram realizadas a cada 5 dias até a maturação celular (21-25 dias). As células foram cultivadas sob condições de temperatura, concentração de CO₂ e umidade controladas, 37°C, 5% e saturação, respectivamente. Todos os procedimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (nº 10321)

4.3. Obtenção do meio condicionado de glioma C6 (CM-C6)

Células de glioma C6 de rato primeiramente cultivadas em garrafas de 25 cm² até alcançar a confluência de 90% foram tripsinizadas, a ação da tripsina foi neutralizada com DMEM/10% SFB, as células foram contadas em microscópio ótico com o uso da câmara de Neubauer e 2×10^5 células foram semeadas em garrafas de 25cm² em 5 mL de DMEM/5% SFB e foram cultivadas por 3 dias até alcançar 90% de confluência. No terceiro dia pós-semeio, o meio foi retirado e substituído pelo meio de cultivo dos astrócitos (DMEM/10% SFB). Após 24 h o sobrenadante do cultivo (meio de cultura condicionado de glioma C6) foi coletado, centrifugado e congelado. As células foram tripsinizadas e contadas para controle entre os meios condicionados obtidos.

4.4. Cocultivos (direto e CM-C6)

Os cocultivos foram realizados de duas formas: direta e indireta. O cocultivo de forma direta foi realizado após a maturação celular dos astrócitos, quando então, simultaneamente a troca de meio foram semeadas 1×10^4 células de glioma C6 por poço em placa de 24 poços. Após tal procedimento, o cocultivo foi mantido por 48 h antes das análises. Culturas de glioma C6 ou de astrócitos cultivados nas mesmas condições e isoladamente foram considerados controle. Em se tratando do cocultivo indireto, ou tratamento com CM-C6, a troca de meio dos astrócitos foi realizada utilizando como meio para substituição 500 µL de meio condicionado previamente preparado e as células foram mantidas por 24 h em condições de cultivo iguais as anteriores. Astrócitos expostos a DMEM/10% SFB foram considerados controle.

4.5. Determinação da hidrólise de nucleotídeos

Para determinação da hidrólise dos nucleotídeos, o meio de cultivo foi retirado e armazenado para a posterior realização do ensaio de greiss, e as células foram lavadas duas vezes com meio de incubação livre de fosfato contendo 2 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glicose, 20 mM HEPES (pH 7.4). Após tal procedimento, as placas foram colocadas em banho-

maria a temperatura de 37°C até o momento das incubações. As incubações para teste de hidrólise foram realizadas com os nucleotídeos ATP, ADP e AMP em concentrações conhecidas de 3mM para os dois primeiros e 1mM para o último. Os meios de incubação foram adicionados de CaCl₂ para incubações com ATP e ADP, e adicionados de MgCl₂ para incubações com AMP, sendo esses cátions divalentes cofatores das enzimas. As incubações aconteceram a 37°C, em banho-maria, por 10 min e foram interrompidas por alteração de pH e diminuição da temperatura, respectivamente pela adição de TCA 10% (ácido tricloroacético a 10% w/v) e colocação das amostras em gelo. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e foram feitos controles de hidrólise para cada nucleotídeo na ausência de células, submetendo-os as mesmas condições.

Após a interrupção da reação enzimática, as amostras foram coradas com verde de malaquita para identificar a presença de Pi (fosfato inorgânico) na solução. Em seguida as amostras foram lidas em espectrofotômetro com filtro para comprimento de onda a 630 nm e as absorbâncias das amostras foram comparadas com a curva padrão de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) para estabelecimento de valores absolutos (Chan et al, 1986).

4.6. Determinação da atividade da iNOS

Após o período de cocultivo direto e indireto, o sobrenadante dos cultivos foi coletado e armazenado em tubos ependorfe de 1,5 mL a -20°C até as análises. Para a avaliação da atividade da iNOS foram colocados 50 µL de amostra por poço em uma placa de 96 poços e após foi adicionado um volume equivalente do reagente de Greiss. As amostras foram incubadas no escuro a temperatura ambiente por 10 min e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm, as leituras foram então comparadas com uma curva padrão de nitrato de sódio para a obtenção dos resultados.

4.7. Determinação proteica

Após as incubações com nucleotídeos, foi retirado todo líquido dos poços e as placas foram congeladas a -20°C. Após o congelamento foi adicionado 100 µL de solução de 1M NaOH e foi feita a raspagem do poço para diluir o conteúdo celular na solução. Após raspagem, 50 µL de cada amostra foi

colocada em um tubo identificado onde então foi adicionado 2,5 mL de solução de coomassie blue. Imediatamente após os tubos foram agitados em vortex e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 590 nm, e os dados foram comparados com a curva padrão de albumina para a obtenção dos valores absolutos de proteína (Bradford et al, 1976).

4.8. Análise estatística

Os dados foram analisados em triplicata, utilizando a quinta versão do *software* GraphPad Prism. Todas as análises foram feitas pelo teste ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey-Kramer, os valores foram considerados significativos para um valor de $P \leq 0,05$. Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão.

5. Resultados

5.1. Análise da hidrólise de ATP, ADP e AMP em cultura de astrócitos cocultivados com glioma C6 ou expostos ao meio condicionado de glioma C6.

Com o objetivo de avaliar o impacto da interação entre gliomas e astrócitos sobre o metabolismo extracelular de nucleotídeos, as culturas de astrócitos foram cocultivadas com células de glioma C6 durante 48 h ou foram expostas ao meio condicionado de glioma C6 durante 24 h. Após a exposição, a atividade das ecto-nucleotidases foi realizada conforme descrito em materiais e métodos. Nossos resultados mostram um aumento significativo de 140% na hidrólise de ATP quando os astrócitos e as células de glioma C6 foram cocultivadas em comparação com ambos os controles, ou seja, tanto com o cultivo isolado de astrócitos quanto com o cultivo isolado de células de glioma C6. A hidrólise do ATP pelas células C6 foi, em média, 50% inferior da atividade encontrada nos astrócitos. Quando olhamos para o tratamento com meio condicionado de C6 observamos que não houve aumento da atividade ATPásica com relação aos controles (Figura 1).

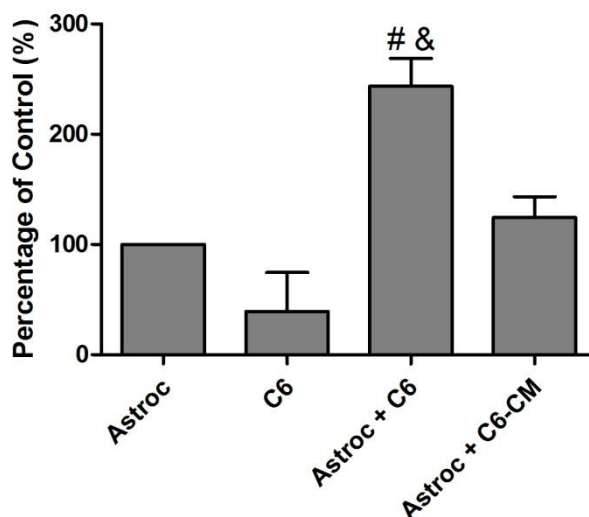


Figura 1. Hidrólise de ATP em cultura de astrócitos cocultivados com glioma C6 ou expostos ao meio condicionado de glioma C6. Dados representam média percentual com relação ao controle \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os

dados foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey-Kramer. # e & indicam diferença significativa do grupo astrócitos e glioma C6, respectivamente, para um $P \leq 0,05$. Astrócitos (Astroc); Glioma C6 (C6); Cocultivo astrócitos e glioma C6 (Astroc + C6); Astrócitos expostos ao meio condicionado de glioma C6 (Astroc + C6-CM).

Quando analisamos a hidrólise de ADP, nossos resultados mostram um aumento na atividade ADPásica quando os astrócitos foram tratados com meio condicionado de glioma C6, mostrando um aumento de até 4x quando comparado com o controle de astrócitos e de até 10 vezes quando comparado com o controle de células de glioma C6. Quando em cocultivo direto há indícios de um aumento, entretanto os resultados não foram significativos. Nossos resultados ainda apontam uma atividade 70% menor da hidrólise de ADP pelas células de glioma C6 quando comparado com as células análogas normais, os astrócitos (Figura 2).

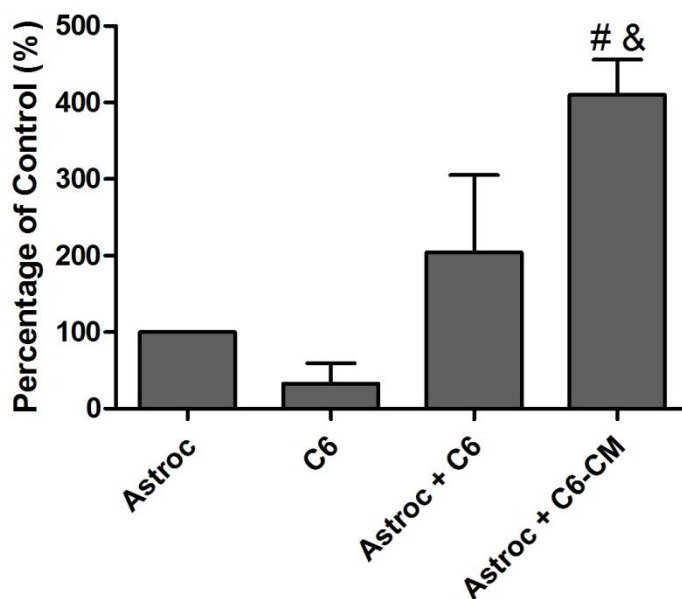


Figura 2. Hidrólise de ADP em cultura de astrócitos cocultivados com glioma C6 ou expostos ao meio condicionado de glioma C6. Dados representam média percentual com relação ao controle \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey-Kramer. # e & indicam diferença significativa do grupo astrócitos e glioma C6,

respectivamente, para um $P \leq 0,05$. Astrócitos (Astroc); Glioma C6 (C6); Cocultivo astrócitos e glioma C6 (Astroc + C6); Astrócitos expostos ao meio condicionado de glioma C6 (Astroc + C6-CM).

Em se tratando da hidrólise do AMP, os resultados que obtivemos indicam um aumento na hidrólise desse nucleotídeo quando os astrócitos foram cocultivados diretamente com glioma C6, o aumento na hidrólise foi de, em média, 2,5 vezes quando comparado com ambos os controles. Células isoladas de glioma C6 apresentaram a mesma atividade AMPásica que os astrócitos do grupo controle. Quando tratados com meio condicionado os astrócitos não apresentaram diferença significativa na hidrólise de AMP (Figura 3).

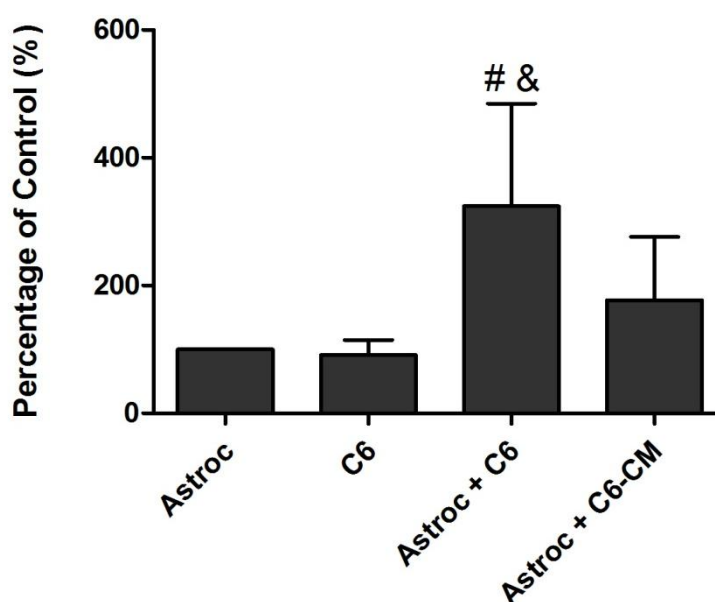


Figura 3. Hidrólise de AMP em cultura de astrócitos cocultivados com glioma C6 ou expostos ao meio condicionado de glioma C6. Dados representam média percentual com relação ao controle \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey-Kramer. # e & indicam diferença significativa do grupo astrócitos e glioma C6, respectivamente, para um $P \leq 0,05$. Astrócitos (Astroc); Glioma C6 (C6); Cocultivo astrócitos e glioma C6 (Astroc + C6); Astrócitos expostos ao meio condicionado de glioma C6 (Astroc + C6-CM).

5.2. Análise da atividade da iNOS em cultura de astrócitos cocultivados com glioma C6 ou expostos ao meio condicionado de glioma C6.

Dados da literatura mostram que existe uma correlação positiva entre a atividade e expressão da iNOS e o aumento de malignidade dos gliomas. Assim, o próximo passo desse trabalho foi avaliar a atividade da iNOS em cultura de astrócitos cocultivadas com glioma C6 ou expostas ao meio condicionado de glioma C6. Nossos experimentos mostram um aumento significativo de mais de 15 vezes na atividade da iNOS em astrócitos cocultivados com glioma C6, quando comparado com astrócitos sozinhos, quando em cocultivo ainda apresentam um aumento de até 3 vezes em comparação às células de glioma C6. Astrócitos tratados com meio condicionado mostraram atividade semelhante a dos astrócitos isolados, e as células de glioma C6 apresentaram atividade cerca de 5 vezes maior quando comparado com os astrócitos, entretanto essa diferença não se mostrou significativa.

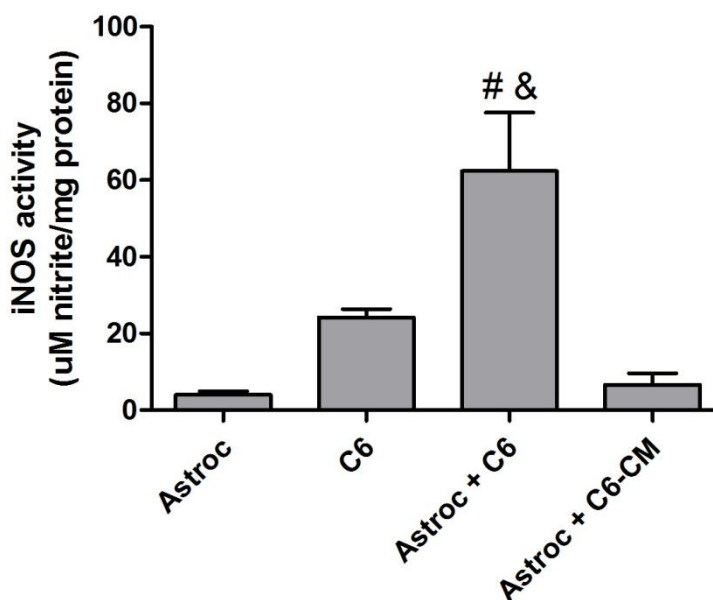


Figura 4. Atividade da iNOS em cultura de astrócitos cocultivados com glioma C6 ou expostos ao meio condicionado de glioma C6. Dados representam média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA

seguido de post-hoc de Tukey-Kramer. # e & indicam diferença significativa do grupo astrócitos e glioma C6, respectivamente, para um $P \leq 0,05$. A atividade da iNOS foi expressa em μM de nitrito formado/mg de proteína. Astrócitos (Astroc); Glioma C6 (C6); Cocultivo astrócitos e glioma C6 (Astroc + C6); Astrócitos expostos ao meio condicionado de glioma C6 (Astroc + C6-CM).

6. Discussão

Diversos estudos mostram o envolvimento de alterações na sinalização purinérgica na progressão dos gliomas (Morrone et al 2003 e 2006; Braganhol et al, 2009). Células de linhagens de gliomas apresentam baixas taxas de hidrólise de ATP e ADP e altas taxas de hidrólise de AMP quando comparados com astrócitos normais em cultura (Wink et al, 2003). O acúmulo de ATP no microambiente tumoral leva a uma progressão tumoral e neurotoxicidade, favorecendo o aumento do tamanho do glioma (Morrone et al, 2003 e 2006). A lise celular originada por morte excitotóxica ou por resecção do tumor, pode liberar ATP intracelular, um agente mitótico para células de glioma (Morrone et al, 2003). A adenosina induz a proliferação celular em diversas linhagens de gliomas humanos, sendo que a maioria dessas linhagens é resistente à morte induzida por concentrações citotóxicas de ATP (Morrone et al, 2005). Moléculas de ATP liberadas no ambiente tumoral, devido a morte de células saudáveis do SNC, podem levar a um aumento na morte dessas células, proporcionando um aumento no espaço para o crescimento do tumor e modulando a proliferação das células tumorais, conforme já dito.

Os efeitos dos nucleotídeos em glioma C6 são regulados pelas ectonucleotidases (por exemplo a E-NPP) bem como pela ativação de purinoreceptores. Gliomas, quando comparados a astrócitos em cultura, apresentam baixa expressão de E-NTPDases, principalmente de NTPDase2, enzima majoritária nos astrócitos de ratos em cultivo. Também foi demonstrado que a NTPDase2, quando expressa seletivamente in vivo, modula positivamente o crescimento tumoral, o ADP originado da ação dessa enzima age de forma a induzir migração de plaquetas para a área do tumor, e além disso, a relação da NTPDase2 com a angiogênese e a inflamação parece ter influência direta na progressão tumoral (Braganhol et al, 2009).

Os resultados apresentados na análise da hidrólise dos nucleotídeos indicam que há processos de sinalização envolvidos entre os astrócitos e os gliomas em termos de indução de malignidade. Em se tratando dos resultados encontrados nas hidrólises de ATP e ADP quando em cocultivo direto, podemos sugerir uma indução na expressão da NTPDase2, presente em

astrócitos e não presente em células de glioma em cultura. Podemos sugerir que a ectonucleotidase envolvida nesse mecanismo é a NTPDase2 uma vez que a hidrólise se mostrou aumentada quando a incubação foi executada com ATP, e houve indícios de aumentos na hidrólise, embora os resultados não tenham sido significativos, em se tratando da hidrólise de ADP. É fundamental novos estudos para localizar esse aumento na expressão na NTPDase2, sendo ela no astrócito ou nas células do glioma, já que assim podemos estabelecer novos mecanismos de tratamento, como por exemplo terapias com RNA de interferência. Caso a hidrólise seja aumentada devido a uma superexpressão dessa enzima nos astrócitos, ela pode estar envolvida em processos de sobrevivência celular, indução de malignidade ou indução de necrose e/ou apoptose de células normais que circundam o tumor.

Ao analisar o tratamento com meio condicionado de gliomas, verificamos um aumento na hidrólise de ADP significativamente maior que os controles, essa hidrólise pode estar relacionada com o fato de gliomas não apresentarem metástases, já que há indícios na literatura de que o ADP ao se ligar em receptores do tipo P2Y₂ (Schumacher et al., 2013) estimulam a migração celular e conseqüentemente a formação de metástases. Essas alterações na sinalização purinérgica ainda podem levar a alterações nos níveis de liberação de GABA e glutamato pelos neurônios próximos, levando a quadros de epilepsia (Burnstock, 2008).

Ao analisar os resultados obtidos na atividade AMPásica percebemos um aumento quando as células estão em cocultivo, indicando um acúmulo de adenosina, atuando como anti-inflamatório no interior do tumor, protegendo o glioma do ataque do sistema imune. Esses resultados podem explicar o fato de ao longo do desenvolvimento tumoral haver uma migração de células imunes para o interior do glioma entretanto sem apresentar resposta adequada, atividade fagocítica e citotóxica das células tumorais, uma vez que pode haver um acúmulo de ATP nas extremidades da massa tumoral, sinalizando que o sistema imune deve migrar e atacar essa região, entretanto ao chegar e se introduzir no tumor para realizar sua atividade, as células se deparam com um ambiente anti-inflamatório gerado por um acúmulo de adenosina. Caso esse fato esteja realmente presente, abre um leque de possibilidades de alvo

terapêutico, como uso de técnicas modernas, como uso de vacinas de DNA ou siRNA, de forma a transfectar as células tumorais com agentes que possam aumentar a hidrólise da adenosina acumulada, impedindo que as células imunes possam ser inativadas ao penetrar o tumor.

Além dos resultados acima, ainda podemos afirmar a indução de malignidade quando analisamos a atividade da iNOS, estando ela responsável pela otimização do estresse tanto oxidativo quanto nitrosativo, agindo em termos de indução da morte celular adjacente ao tumor, aumentando a circulação sanguínea na região do tumor, bem como induzindo a formação de novos vasos, otimizando assim a progressão tumoral. Sendo o glutamato um gliotransmissor, e estando sua catabolização à glicina dentro do astrócito alterada pelos altos níveis de NO, podemos supor que os astrócitos passam a liberar mais glutamato nas sinapses, agindo assim, de forma a induzir neurotoxicidade glutamatérgica. Esses altos índices de NO formados também podem ser responsáveis pelo aumento da permeabilidade da barreira cérebro-sangue, favorecendo assim, a entrada de tipos celulares tipicamente sistêmicos no ambiente cerebral, como por exemplo, os macrófagos.

Em estudos recentes tem demonstrado que a atividade da iNOS está relacionada não só com os fatores já descritos mas também com a indução da proliferação de células tronco tumorais levando a formação de tumores. Além da iNOS agir na via da EGFRvIII/STAT3 uma via de sinalização oncogênica chave no GBM, que por fim vai levar o STAT3 a se ligar ao promotor do gene da iNOS, modulando positivamente sua expressão (Jahani-Asl, 2013).

Os dados, num geral, indicam a importância do contato célula-célula no processo de cocultivo. Provavelmente moléculas de adesão possam estar envolvidas nas alterações observadas ao longo dos experimentos, uma vez que tais estruturas podem conter reservas de fatores de crescimento, citocinas e outros mediadores biológicos que modulam diversas vias sinalizadoras. Particularmente as alterações na atividade AMPásica se enquadram nesse aspecto, já que a enzima responsável por esse tipo de hidrólise é também classificada como um molécula de adesão celular.

7. Conclusão

Com nossos resultados podemos concluir a importância de maiores estudos sobre a contribuição do microambiente tumoral, mais particularmente dos astrócitos, sobre a progressão dos gliomas, além do estabelecimento de novos mecanismos de estudo desse microambiente. Duas vias muito importantes foram alteradas nas condições de cocultivo, tanto indireto, quanto direto, principalmente. Novos estudos se mostram necessários para o estabelecimento de quais vias intracelulares estão envolvidas nas alterações encontradas, bem como estudos de expressão gênica para abrir possibilidade de como se dão essas relações intercelulares, provavelmente, vitais para o estabelecimento dos gliomas, mais especificamente de glioblastomas multiformes.

Referências Bibliográficas

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacological Reviews**, v.58, n.3, p.281-341, 2006.

Andrade SP, Hart IR, Piper PJ. Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature. **British Journal of Pharmacology**, v.107, n.4, 1992.

Asthagiri AR, Pouratian N, Sherman J, Ahmed G, Shaffrey ME. Advances in brain tumor surgery. **Neurologic Clinics**, v.25, n.4, p.975-1003, 2007.

Bakshi A, Nag TC, Wadhwa S, Mahapatra AK, Sarkar C. The expression of nitric oxide synthases in human brain tumours and peritumoral areas. **The Journal of Neurological Sciences**, v.155, n.2, p.196-203, 1998.

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

Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sévigny J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v.43, n.18, p.5511-2219, 2004.

Blass-Kampmann S, Kindler-Röhrborn A, Deissler H, D'Urso D, Rajewsky MF. In vitro differentiation of neural progenitor cells from prenatal rat brain: common cell surface glycoprotein on three glial cell subsets. **Journal of Neuroscience Research**, v.48, n.2, p.95-111, 1997.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.218-541, 1976.

Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppes D, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AM. Selective NTPDase2 expression

modulates in vivo rat glioma growth. **Cancer Science**, v.100, n.8, p.1434-1442, 2009.

Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, n.2, p.682-685, 1990.

Bromberg JE, van den Bent MJ. Oligodendrogliomas: molecular biology and treatment. **The Oncologist**, v.14, n.2, p.155-163, 2009.

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

Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews. Neuroscience**, v.8, n.10, p.766-775, 2007

Chadwick BP, Frischauf AM. The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. **Genomics**, v.50, n.3, p.357-367, 1998.

Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca-ATPase activity. **Anal Biochem**, v.157, p.375-380, 1986.

Chintala SK, Tonn JC, Rao JS. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.17, n.5-6, p. 495-502, 1999.

CHUNG Y. HSU, ARIF SHAIKH, CHEN-HSIUNG YEH, LAURA L. DUGAN, TIEN-SUNG LIN, JIAN XU. Enhancement of Apoptosis in Cerebral Endothelial Cells by Selected Inflammatory Signals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.823, p.148-153, 1997.

Cullis ER, Kalber TL, Ashton SE, Cartwright JE, Griffiths JR, Ryan AJ, Robinson SP. Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the

vascular disrupting agent ZD6126. **Microvascular Research**, v.71, n.2, p.76-84, 2006.

Dai C, Holland E. Glioma models. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1551, p. 19-27, 1999.

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

Farias-Eisner R, Sherman MP, Aeberhard E, Chaudhuri G. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, n.20, 1994.

Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, n.5, p.1788-1792, 1991.

Fuss B, Baba H, Phan T, Tuohy VK, Macklin WB. Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.23, p.9095-9103, 1997.

Goding JW, Grobden B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1638, n.1, p.1-19, 2003.

Grobden B, Anciaux K, Roymans D, Stefan C, Bollen M, Esmans EL, Slegers H. An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma. **Journal of Neurochemistry**, v.72, n.2, p.826-834, 1999.

H.H.H.W. Schmidt, J.S. Pollock, M. Nakane, U. Förstermann, F. Murad Ca²⁺/calmodulin – regulated nitric oxide synthases. **Cell Calcium**, v.13, n.6–7, p.427–434, 1992.

Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. **European Journal of Biochemistry**, v.262, n.1, p.102-107, 1999.

Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. **Nature Reviews. Neuroscience**, v.2, n.3, p.185-193, 2001.

Jahani-Asl A, Bonni A. iNOS: a potential therapeutic target for malignant glioma. **Current Molecular Medicine**, v.13, n.8, p.1241-1249, 2013.

Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.51, p.33116-33122, 1996.

Kaloshi G, Guillevin R, Martin-Duverneuil N, Laigle-Donadey F, Psimaras D, Marie Y, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Sanson M. Gray matter involvement predicts chemosensitivity and prognosis in gliomatosis cerebri. **Neurology**, v.73, n.6, p.445-449, 2009.

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

Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR, Zimmermann H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. **Neuropharmacology**, v.36, n.9, p.1189-1200, 1997.

Kim KH, Yeon SM, Kim HG, Choi HS, Kang H, Park HD, Park TW, Pack SP, Lee EH, Byun Y, Choi SE, Lee KS, Ha UH, Jung YW. Diverse Influences of Androgen-Disrupting Chemicals on Immune Responses Mounted by Macrophages. **Inflammation**, [<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10753-013-9781-1>] 2013

Kimelberg HK, Katz DM. High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. **Science**, v.228, n.4701, p.889-891, 1985.

Kostourou V, Cartwright JE, Johnstone AP, Boulton JK, Cullis ER, Whitley G, Robinson SP. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. **British Journal of Cancer**, v.104, n.1, p.83-90, 2011

Kurose I, Miura S, Higuchi H, Watanabe N, Kamegaya Y, Takaishi M, Tomita K, Fukumura D, Kato S, Ishii H. Increased nitric oxide synthase activity as a cause of mitochondrial dysfunction in rat hepatocytes: roles for tumor necrosis factor alpha. **Hepatology**, v.24, n.5, p.1185-1192, 1996.

Laws ER Jr, Shaffrey ME. The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.17, n.5-6, p.413-420, 1999.

Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **The New England Journal of Medicine**, v.9, n.330, p.613-622, 1994.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v.114, n.2, p.97-109, 2007.

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

Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C, et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. **Journal of Immunology**, v.153, n.8, p.3574-3583, 1994.

Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJ, Salbego CG, Lenz G, Battastini AM. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. **Journal of Neuro-oncology**, v.71, n.2, p.135-140, 2005.

Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, Bernardi A, Schwartzmann G, Rodnight R, Lenz G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. **Journal of Neuro-oncology**, v.64, n.3, p.211-218, 2003.

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

Paulus W, Tonn JC. Interactions of glioma cells and extracellular matrix. **Journal of Neuro-oncology**, v.1, n.24, p.87-91, 1995.

Piccirillo SG, Binda E, Fiocco R, Vescovi AL, Shah K. Brain cancer stem cells. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v.87, n.11, p.1087-1095, 2009.

Piccirillo SG, Vescovi AL. Brain tumour stem cells: possibilities of new therapeutic strategies. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v.7, n.8, p.1129-1135, 2007.

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

Privat A. Treatment of the future for spinal cord injuries. **La Revue du Praticien**, v.45, n.16, p.2051-2056, 1995

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

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

Sathornsumetee S, Cao Y, Marcello JE, Herndon JE 2nd, McLendon RE, Desjardins A, Friedman HS, Dewhirst MW, Vredenburgh JJ, Rich JN. Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in

malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan. **Journal of Clinical Oncology**, v.26, n.2, p.271-278, 2008.

Sathornsumetee S, Rich JN. Designer therapies for glioblastoma multiforme. **Annal of the New York Academy of Sciences**, v.1142, p.108-132, 2008.

Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. **Cancer cell**, v.24, n.1, p.130-137, 2013.

Shao Y, McCarthy KD. Plasticity of astrocytes. **Glia**, v.11, n.2, p.147-155, 1994

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v.432, n.7015, p.396-401, 2004

Stefan C, Jansen S, Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **Trends in Biochemical Sciences**, v.30, n.10, p.542-550, 2005.

Stieber VW. Low-grade gliomas. **Current Treatment Options in Oncol**, v. 2, p. 495-506, 2001.

Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.169, n.5, p.1543-1555, 1989.

Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. **Journal of Clinical Oncology**. 2007; 25: 4127–36.

Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, Mason WP, Weller M, Mirimanoff RO, Cairncross JG; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. **The oncologist**, v.11, n.2, p.165-180, 2006.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC,

Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v.352, n.10, p.987-996, 2005.

Tzeng E, Kim YM, Pitt BR, Lizonova A, Kovesdi I, Billiar TR. Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis. **Surgery**, v.122, n.2, p.255-263, 1997.

van den Bent MJ. Anaplastic oligodendroglioma and oligoastrocytoma. **Neurologic Clinics**, v.27, n.4, p.1089-1109, 2007

Vougioukas VI, Weber J, Scheufler KM. Clinical and radiological results after parapedicular screw fixation of the thoracic spine. **Journal of Neurosurgery: Spine**, v.3, n.4, p.283-287, 2005.

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

Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Lenz G, Zerbini LF, Libermann TA, Sévigny J, Battastini AM, Robson SC. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. **Neuroscience**, v.138, n.2, p.421-432, 2006.

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

Xie K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Gutman M, Xie QW, Nathan C, Fidler IJ. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.181, n.4, 1995.

Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, v.256, n.5054, p.225-228, 1992.

Yang T, Witham TF, Villa L, Erff M, Attanucci J, Watkins S, Kondziolka D, Okada H, Pollack IF, Chambers WH. Glioma-associated hyaluronan induces apoptosis in dendritic cells via inducible nitric oxide synthase: implications for the use of dendritic cells for therapy of gliomas. **Cancer Research**, v.62, n.9, p.1583-2591, 2002

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

Zhao H, Dugas N, Mathiot C, Delmer A, Dugas B, Sigaux F, Kolb JP. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. **Blood**, v.92, n.3, p.1031-1043, 1998.

Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signaling**, v.8, n.3, p.437-502, 2012.

Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **The Biochemical journal**, v.285, p.345-365, 1992.

Zimmermann HG, Neuneier R, Grothmann R. Multi-agent modeling of multiple FX-markets by neural networks. **IEEE Transactions on Neural Networks**, v.12, n.4, p.735-743, 2001.

Zimmermann HG, Neuneier R, Grothmann R. Multi-agent modeling of multiple FX-markets by neural networks. **IEEE Transactions on Neural Networks**, v.12, n.4, p.735-743, 2001