

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



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

Investigação do efeito entre cocultivo de macrófagos e glioma GL261 na modulação do sistema purinérgico

Juliana Hofstätter Azambuja

Pelotas, 2014

Juliana Hofstätter Azambuja

**Investigação do efeito do cocultivo entre macrófagos e glioma GL261
na modulação do sistema purinérgico**

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. Rosélia Maria Spanevello, Dra.

Orientadora de Estágio: Profa. Elizandra Braganhol, Dra.

Pelotas, 2014

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

A991i

Azambuja, Juliana Hofstätter

Investigação do efeito entre cocultivo de macrófagos e glioma GL261 na modulação do sistema purinérgico / Juliana Hofstätter Azambuja. – 46f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientadora Rosélia Maria Spanevello.

1.Biotecnologia. 2.Glioma. 3.Macrófago. 4.Sistema purinérgico. I.Spanevello, Rosélia Maria. II.Título.

CDD: 572

Banca avaliadora:

Profa. Rosélia Maria Spanevello, Dra. (orientadora), UFPEL

Profa. Giana de Paula Cognato, Dra, UFPEL

Elita Ferreira da Silveira, Msc, FURG

Agradecimentos

À minha família, pelo apoio incondicional durante todos os momentos, por terem sido incansáveis em perseguir os nossos objetivos e acreditarem nos meus sonhos, vocês são grandes exemplos e fonte de inspiração que tornaram essa realização possível.

À minha querida orientadora, Dra Elizandra Braganhol pela confiança, paciência, empenho, por ter dividido um enorme conhecimento comigo possibilitando meu crescimento profissional e amadurecimento e além de tudo por nunca ter deixado faltar um abraço apertado e um sorriso de incentivo.

À minha orientadora, Dra Rosélia Spanevello por toda a ajuda durante os experimentos do purinérgico, por ter me ouvido e orientado sempre com muita dedicação e acima de tudo por ter representando um porto seguro.

Agradeço também a todos os colegas do Neurocan pelo convívio profissional e apoio, especialmente a Nathalia pela ajuda na realização dos experimentos.

À amiga e colega Elita pela ajuda e dedicação durante a realização dos experimentos, por ter me recebido e ensinado com paciência e carinho, pela amizade e apoio em todos os momentos que eu precisei. Tua presença e orientação foram indispensáveis para minha formação e para a realização deste trabalho, contigo aprendi a lutar pelo meu sonho independente das dificuldades.

À colega Taíse por ser incansável e extremamente dedicada, muito obrigado por todos os finais de semana e feriados dedicados aos experimentos.

Às minhas colegas de graduação Natasha e Daniele pelo apoio, amizade, paciência, companheirismo durante esses quatro anos.

À Universidade Federal de Pelotas, através do Centro de Desenvolvimento Tecnológico e ao Núcleo de Biotecnologia, pelo empenho na minha formação.

À Fapergs pelo incentivo científico, através de apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para esse momento, meu sincero muito obrigado.

Resumo

AZAMBUJA, Juliana Hofstätter. **Estudo do efeito entre cocultivo de macrófagos e glioma GL261 na modulação do sistema purinérgico.** 2014. 49f. Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Gliomas são tumores que acometem o sistema nervoso central e compartilham semelhanças morfológicas e expressão gênica com células gliais. O glioblastoma multiforme (GBM) constitui a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral, são instáveis geneticamente, com grande capacidade de infiltração, angiogênese e resistência à quimioterapia. Alterações no sistema imune e do sistema purinérgico têm sido descritas como vias envolvidas na progressão destes tumores, onde a presença de um infiltrado inflamatório é correlacionado positivamente com a malignidade e um pior prognóstico para pacientes com GBM. Além disso, o sistema purinérgico está envolvido em diversos eventos fisiopatológicos e um fator importante que modula a resposta mediada por nucleotídeos é o metabolismo extracelular dos mesmos, catalisado pelas ectonucleotidases. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto da interação entre os macrófagos e as células de gliomas sobre a atividade das ectonucleotidases em macrófagos. Para tanto, 30 min após a realização do cultivo primário de macrófagos, estas células foram expostas ao meio condicionado de glioma GL261 ou ao cocultivo direto com células de glioma durante 24 h. Após o término deste período a atividade das ectonucleotidases foi determinada pelo método de verde de malaquita. Após a análise das células em cocultivo observamos uma redução significativa de aproximadamente 45% na hidrólise de ATP e 40% na hidrólise de ADP e AMP quando comparamos com os macrófagos cultivados isoladamente. Por outro lado, quando a cultura de macrófagos foi exposta ao meio condicionado de glioma houve uma redução significativa de 40% na atividade ATPásica, porém não houve diferença na hidrólise de ADP e AMP. Estes resultados sugerem um acúmulo de ATP no meio extracelular, portanto foi realizada a determinação do efeito do ATP sobre a proliferação destas culturas pelo método de sulfarodamina B. Nossos resultados demonstram que quando as células são

expostas a concentrações de ATP de 100 μ M e 1mM ocorre um aumento da proliferação de cerca de 30% apenas quando elas se encontram em cocultivo. Nossos resultados corroboram com a teoria que existe uma comunicação entre glioma e macrófago que visa à proliferação do tumor e ainda sugerimos um possível sistema envolvido nesta comunicação.

Palavras-chave: glioma, macrófagos, sistema purinérgico.

Abstract

AZAMBUJA, Juliana Hofstätter. **Study of the effect of coculture of macrophages and glioma GL261 in the modulation of purinergic system.** 2014. 49f. Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Gliomas are tumors that affect the central nervous system and share morphological similarities and gene expression in glial cells. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and devastating form of brain tumor, is genetically unstable, with large capacity for infiltration, angiogenesis, and resistance to chemotherapy. Alterations in the immune system and the purinergic system have been described as pathways involved in the progression of these tumors, where the presence of an inflammatory infiltrate is positively correlated with malignancy and poor prognosis for patients with GBM. Furthermore, the purinergic system is involved in many pathophysiologic processes and an important factor that modulates the response is mediated by extracellular nucleotides thereof metabolism catalyzed by ectonucleotidases. Therefore, the aim of this study was to evaluate the impact of the interaction between macrophages and cells of gliomas on the activity of ectonucleotidases in macrophages. For that, 30 min after completion of the primary culture of macrophages, these cells were exposed to the conditioned media glioma GL261 or direct coculture in glioma cells for 24 h. After expiration of this period the activity of ectonucleotidases was determined by the malachite green. After the examination of cells in coculture observed a significant reduction of approximately 45% in ATP hydrolysis and 40% in the hydrolysis of ADP and AMP when compared with macrophages cultured alone. On the other hand, when the culture was exposed to macrophage-conditioned medium glioma there was a significant 40% reduction in ATPase activity, but no difference in the hydrolysis of ADP and AMP. These results suggest an accumulation of ATP in the extracellular medium, thus determining the effect of ATP was performed on the proliferation of these cultures by the method of sulfarodamina B. Our results demonstrate that when cells are exposed to concentrations of ATP 100 μ M e 1mM occurs an increase in proliferation of 30% only when they are in

coculture. Our results support the theory that there is a communication between glioma and macrophage aimed at the tumor proliferation and further suggest a possible system involved in this communication.

Keywords: glioma, macrophage purinergic system.

Lista de Figuras

Figura 1 - Participação do microambiente na malignidade dos gliomas.....	22
Figura 2 - Análise da hidrólise de ATP em cultura de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma GL261	33
Figura 3 - Análise da hidrólise de ADP em cultura de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma GL261.....	34
Figura 4 - Análise da hidrólise de AMP em cultura de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma GL261.....	35
Figura 5 - Análise da proliferação em cultura de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma GL261 após tratamento com ATP.....	36

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

µg - Micrograma
µl - Microlitro
µM - Micromolar
ADP - Adenosina difosfato
AMP - Adenosina monofosfato
APCs - Células apresentadoras de antígenos
ATCC - American Type Culture Collection
ATP - Adenosina trifosfato
CD73 - Ecto-5'-nucleotidase
DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
E-NPP - Pirofosfatase ectonucleotidases
GBM - Glioblastoma multiforme
IFN-γ - Interferon gama
IL - Interleucina
iNOS - NOS induzida
LPS - Lipopolisacarídeo
M1 - Macrófagos ativados de forma clássica
M2 - Macrófagos ativados de forma alternativa
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos
MHC - Complexo de histocompatibilidade
MIP-1a - Proteína inflamatória de macrófago -1a
NTPDase - Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
OMS – Organização Mundial da Saúde
P1 – Receptor de Adenosina
P2X- Receptor purinérgico ionotrópico
P2Y- Receptor purinérgico metabotrópico
ROIs - Intermediários reativos do oxigênio
SFB – Soro Fetal Bovino
SNC - Sistema Nervoso Central
TGF-α - Fator de necrose tumoral- alfa
TGF-beta - Fator de necrose tumoral- beta
TMZ - Temozolomida

TNF - Fator de necrose tumoral

UDP - Uridina difosfato

UTP - Uridina trifosfato

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

Sumário

1	Introdução	14
2	Objetivos.....	16
2.1	Objetivos específicos	16
3	Revisão bibliográfica	17
3.1	Gliomas.....	17
3.1.1	A origem dos gliomas.....	17
3.1.2	Taxa de incidência dos gliomas.....	18
3.1.3	Classificação dos gliomas.....	18
3.1.3.1	O glioblastoma multiforme (GBM)	19
3.1.4	O tratamento dos gliomas	20
3.2	O processo inflamatório e os macrófagos	21
3.2.1	O Fenótipo de Ativação dos Macrófagos	22
3.3	A Imunologia do Câncer.....	23
3.4	Sistema Purinérgico.....	24
3.4.1	Receptores Purinérgicos.....	25
3.4.2	As Ectonucleotidasas	27
3.4.3	Sistema purinérgico e a resposta imune	29
4	Materiais e Métodos	32
4.1.	Cultivo da linhagem de glioma de camundongo GL261.....	32
4.2.	Cultivo de macrófagos.....	32
4.3.	Obtenção do meio condicionado (CM) de glioma GL261	32
4.4.	Exposição dos macrófagos ao MC de glioma ou ao cocultivo com glioma GL261.....	33
4.5.	Determinação da hidrólise de nucleotídeos.....	33
4.6.	Tratamento dos cultivos celulares com ATP e determinação da proliferação celular pelo método da sulfarodamina B	34
4.7.	Determinação da proteína	34
4.8.	Análise estatística.....	35
5	Resultados e discussão.....	36
5.1	Análise da hidrólise de ATP, ADP e AMP em cultura de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma.....	36
5.2	Análise do efeito do ATP sobre a proliferação de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma GL261.....	39
6	Conclusão.....	41
7	Referências.....	42

1 Introdução

Câncer é o termo utilizado para um conjunto de doenças em que as células se dividem de maneira anormal, descontrolada e com capacidade de invadir tecidos periféricos e/ou outros órgãos que não o seu de origem (Inca, 2013).

Gliomas são tumores que surgem no sistema nervoso central e que compartilham semelhanças morfológicas e expressão gênica relacionadas às células gliais, tais como astrócitos, oligodendrócitos e seus precursores (Holland, 2001). A ativação ou supressão de vias de transdução de sinal celular e a resistência à irradiação e à quimioterapia estão associadas com as anormalidades genéticas e moleculares comuns a glioblastomas, contribuindo para a progressão do glioma maligno (Yamanaka et al., 2009).

Estudos recentes indicam que apenas a ocorrência de mutações genéticas não assegura a formação e a progressão tumoral, onde a formação de um microambiente favorável constituído principalmente por células estromais, imunes e rico em fatores de crescimento e citocinas também teriam papel significativo nesse processo. Um infiltrado inflamatório constituído de macrófagos é correlacionado positivamente com a malignidade e um pior prognóstico para pacientes com glioma, sendo que células do sistema imune representam, no mínimo, um terço do total da massa tumoral (Morimura et al., 1990). Porém, o papel dessas células na progressão do glioma permanece controverso. Estudos relataram que as funções antitumorais do infiltrado inflamatório associado aos gliomas estão comprometidas e que macrófagos presentes no ambiente tumoral seriam estimulados a adquirir um fenótipo de ativação M2, levando a imunossupressão (Komohara et al., 2008). Além disso, tem sido proposto que para promover o crescimento do tumor os macrófagos aumentam a secreção de fatores de crescimento, citocinas, supressores imunológicos e fatores angiogênicos (Wagner et al., 1999).

Além de um ambiente inflamatório propício, alterações no sistema purinérgico estão envolvidas na progressão dos gliomas (Braganhof et al, 2009). A sinalização purinérgica tem consequências imunológicas em pacientes com câncer, o ATP atua como molécula sinalizadora de dano desencadeando uma resposta do sistema imune (Zimmermann, 1994). Estudos

demonstram que in vivo o ATP se acumula na periferia do tumor controlando a resposta inflamatória e levando a progressão tumoral (Braganhol et al, 2010). Portanto, desvendar a relação dos gliomas com o ambiente inflamatório e a modulação sobre a atividade do sistema purinérgico em macrófagos faz-se necessário para elucidar mecanismos de comunicação entre estas células e ainda sistemas envolvidos na progressão tumoral, para no futuro possibilitar o desenvolvimento de imunoterapias eficientes para pacientes acometidos por glioma.

2 Objetivos

Considerando que alterações na sinalização purinérgica e um microambiente inflamatório estão envolvidos com a progressão tumoral, o objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto da interação entre os macrófagos e as células de gliomas sobre a atividade das ectonucleotidases em macrófagos. Para tanto, os macrófagos foram expostos ao meio condicionado ou foram cocultivados com células de gliomas.

2.1 Objetivos específicos

- Análise do efeito do cocultivo de linhagem de glioma de camundongo GL261 sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongo;
- Análise do efeito da exposição ao meio condicionado de linhagem de glioma de camundongo GL261 sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongo;
- Investigação do efeito do ATP sobre a proliferação de cultura de glioma GL261, macrófagos expostos ou não ao meio condicionado e em cocultivo com gliomas.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Gliomas

3.1.1 A origem dos gliomas

O desenvolvimento do câncer resulta, em parte, de mutações em um ou mais genes, que regulam o crescimento celular e a morte celular programada (Thompson, 2008).

Tradicionalmente, acreditava-se que o cérebro humano adulto não continha precursores celulares e que tumores cerebrais derivavam somente de células adultas (Sanai et al., 2005). Segundo essa teoria, os gliomas seriam originados exclusivamente a partir de uma célula glial adulta que passasse por um processo de desdiferenciação. Dessa forma, células gliais maduras como astrócitos e os oligodendrócitos, que tivessem sofrido mutações em oncogenes dariam início ao processo de formação do tumor, porém teorias mais recentes indicam que além desses mecanismos os gliomas também podem ser originados por uma célula tronco neural ou ainda por uma célula progenitora que sofra transformação. Além disso, evidências recentes sugerem que um subconjunto de células cancerosas, denominado cancer stem cell-like, possa ser à base do crescimento de diferentes tipos de câncer incluindo tumores cerebrais primários (Singh et al., 2004).

A alta malignidade associada ao rápido crescimento dos gliomas suporta a hipótese da existência das células-tronco tumorais (Singh et al., 2004). A longa vida dessa população celular lhe permite acumular mutações, tornando-a uma ideal candidata a fomentar a evolução e a malignidade tumoral (Siebzehnrubl et.al., 2011). Essas células apresentam papel crucial na sobrevivência, progressão e resistência à quimioterapia, uma vez que promovem a angiogênese tumoral e metástases, além de resistirem a hipóxia (Huang et al., 2010).

3.1.2 Taxa de incidência dos gliomas

Câncer é atualmente é uma das principais causas de morte em todo o mundo, representando um dos principais problemas de saúde pública (Pelengaris, 2006). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não-melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (Inca, 2013).

Para o Brasil estimam-se 4.960 casos novos de câncer do Sistema Nervoso Central (SNC) em homens e 4.130 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,07 casos novos a cada 100 mil homens e 4,05 a cada 100 mil mulheres, mesmo não sendo muito frequente, o câncer de SNC contribui significativamente para a morbidade global (Inca, 2013).

Os tumores do sistema nervoso central são a segunda maior causa de neoplasias malignas durante a infância e, essa incidência em adultos aumenta com a idade (Louis et al., 2002).

3.1.3 Classificação dos gliomas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2007 classificou os gliomas para determinar o tipo de terapia utilizada no tratamento, baseado em três parâmetros: tipo celular, localização tumoral e grau de malignidade (Louis et al., 2007).

Em relação ao tipo celular, os gliomas são divididos em subgrupos baseados na morfologia histológica e similaridade das suas células com células da glia diferenciadas. Desta forma, são classificados, segundo a OMS em astrocitomas (derivados de astrócitos ou dos seus precursores), oligodendrogliomas (derivados de oligodendrócitos ou dos seus precursores) e oligoastrocitomas (linha mista), sendo estes, os três maiores subgrupos. No entanto, existe outro subgrupo, os ependimomas, (derivados de células ependimárias ou dos seus precursores) que, ocorrem com uma menor frequência (Kleihues , 2000) (Louis et al., 2007).

Além disso, os tumores do SNC podem ser classificados pela OMS de acordo com o grau de malignidade, características histológicas e alterações

genéticas (Louis et al, 2007). Segundo OMS, as lesões de grau I têm um baixo poder proliferativo e são considerados tumores benignos e curáveis com a completa ressecção cirúrgica (Burger et al 2000). As lesões de grau II têm atividade proliferativa pouco intensa, mas são recorrentes e podem se transformar em tumores mais agressivos de graus III e IV, sendo considerados tumores malignos. Os gliomas de grau III exibem aumento de anaplasia e proliferação, porém os gliomas de grau IV também conhecidos como glioblastoma multiforme (GBM) são tumores altamente invasivos, agressivos, neurologicamente destrutivos e de maior prevalência (Holland, 2001). A classificação em relação à localização tumoral se refere ao local onde os gliomas se desenvolvem com base na membrana que separa o cérebro do cerebelo, onde os gliomas que se desenvolvem acima dessa membrana são denominados supra-tentoriais e os que se desenvolvem abaixo são os infra-tentoriais (Vougioukas et al., 2005).

Os gliomas também podem ser separados em duas categorias: os primários quando evoluem em um local sem lesão prévia, respondendo por 90% dos casos diagnosticados, e os secundários, quando evoluem de tumores de menor grau (Kleihues et al. 2002).

3.1.3.1 O glioblastoma multiforme (GBM)

O glioblastoma multiforme constitui a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral e representa cerca de 50% de todas as neoplasias do SNC (Holland, 2001). Tais tumores são caracterizados por uma população heterogênea de células geneticamente instáveis, grande capacidade de infiltração, angiogênese e resistência à quimioterapia (Wen et al 2008).

Entre as principais características histológicas observáveis, destaca-se o polimorfismo celular, mitose, hiperplasticidade, traduzida pela proliferação de células imaturas, citoplasma de limites imprecisos, atipias nucleares, trombose vascular e proliferação microvascular (Kleihues, 2000). O GBM apresenta alta taxa de crescimento, o que resulta em extensas áreas de destruição do tecido nervoso, causando edema, necrose e lesões infiltrativas no tecido cerebral que circunda o tumor (Laws et al, 1999). Tais características ainda levam a um crescimento rápido e a altos índices de recorrência (Stupp et al., 2009).

3.1.4 O tratamento dos gliomas

A estratégia padrão utilizada para o tratamento dos gliomas é a ressecção cirúrgica sempre que possível, com posterior diagnóstico estabelecido por critérios histopatológicos (Louis et al., 2007), seguido por seis semanas de radioterapia com terapia sistêmica concomitante com temozolomida (TMZ) que é mantido como terapia adjuvante por no mínimo seis meses (Mrugala et al., 2013).

Pacientes com GBM apresentam uma sobrevida média de 12-14 meses após o diagnóstico. Quando comparado com a radioterapia administrada isoladamente, somente a combinação de quimioterapia com TMZ aumenta a média da sobrevida para 14,6 meses versus 12,1 meses (Stupp et al., 2005). O prognóstico continua extremamente ruim porque as células neoplásicas invadem o parênquima cerebral dificultando a completa remoção do tumor e são naturalmente resistentes à maioria dos fármacos citotóxicos e a radioterapia (Lefranc et al., 2005).

A TMZ é um pró-fármaco administrado de forma oral, atua como agente alquilante que induz danos no DNA, levando à morte celular principalmente por apoptose. Algumas características da TMZ que a tornam atrativa para o tratamento de gliomas incluem a sua capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica, o fato de estar geralmente associada a uma baixa toxicidade e ser espontaneamente hidrolisada a um metabolito ativo methyltriazenoimidazole-carboxamide (MITC) (Newlands et al., 1997). No entanto, várias vias de reparo do DNA promovem o desenvolvimento de resistência ao TMZ (Yoshimoto et al., 2012), levando a um impacto negativo na sobrevivência dos pacientes já que atualmente não existe um tratamento padrão para pacientes com recidiva/GBM resistente, sendo este um problema clínico significativo (Oliva et al., 2010).

3.2 O processo inflamatório e os macrófagos

Estímulos pró-inflamatórios, metabólicos e imunológicos causam recrutamento de monócitos aos tecidos periféricos, onde ocorre uma diferenciação destas células em macrófagos e células dendríticas, os quais recebem nomes específicos de acordo com a função e o local em que se encontram (Hume et al., 2006).

A população de macrófagos residentes em diferentes órgãos como os macrófagos peritoneais (peritônio), as células de Kupfer (fígado) e a microglia (SNC) adaptam-se ao seu microambiente. Os sinais responsáveis pela especialização dos macrófagos, específico em cada tecido, incluem produtos secretados, a superfície de células vizinhas e a composição da matriz extracelular (Gordon et al., 2003). Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e fazem parte, principalmente, da primeira linha de defesa contra patógenos, podendo ser identificados pela presença do marcador de superfície CD14 (Wright et al., 1990).

Os macrófagos detêm como funções principais eliminar micro-organismos através de fagocitose; apresentar ao sistema imune os antígenos por meio do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), sendo caracterizados como células apresentadoras de antígenos (APCs); e ativar os outros tipos celulares envolvidos com a resposta imune celular (Abbas, 2001). Além disso, os macrófagos são células com extensa participação em eventos regulatórios e participam tanto da resposta imune inata como da adquirida (Klimp et al., 2002).

Quando em estado latente, monócitos e macrófagos caracterizam-se por baixa síntese proteica, produção de citocinas e taxa de consumo de oxigênio (Hume et al., 2002). Entretanto, uma vez iniciado processos de inflamação por danos teciduais ou infecções, tais células passam por um processo de ativação que promove aumento na produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios. Muitos são os mecanismos capazes de gerar uma mudança no perfil de ativação dos macrófagos. Entre eles, podemos citar sinais endógenos de perigo, como dano celular (Zhang et al., 2008), além de fatores de sinalização, como a produção diferencial de citocinas de linfócitos Th1 e Th2 da resposta imune inata e adaptativa, que são capazes de levar ao

aumento da produção de fatores com atividade antimicrobial ou levar à susceptibilidade a infecções (Abbas, 2001).

Uma classificação muito usada para determinar os tipos de respostas que os macrófagos geram é a designação M1 (macrófagos ativados de forma clássica com função pró-inflamatória) e M2 (macrófagos ativados de forma alternativa com função anti-inflamatória), que marcam tipos fenotípicos distintos e opostos de macrófagos a um determinado tipo de resposta (Gordon et al., 2003).

3.2.1 O Fenótipo de Ativação dos Macrófagos

Os macrófagos ativados de forma clássica (M1) são caracterizados por alta capacidade de apresentação de antígenos, produção de interleucinas 12 e 23 (IL-12; IL-23) e de intermediários tóxicos como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, visando a eliminação de micro-organismos e de células tumorais (Gurbuxani et al., 2001). A polarização M1 de macrófagos pode ser induzida por lipopolissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulador de colônia de granulócito/monócito (Mytar et al., 1999).

Os macrófagos ativados de forma alternativa (M2) são caracterizados por alta atividade da enzima arginase, baixa produção de citocinas inflamatórias e alta produção de mediadores anti-inflamatórios como a interleucina 10 (IL-10), o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) (Ginderachter et al., 2006) e a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o qual ativa angiogênese e tumorigênese (Mytar et al., 1999). Células que assumem esse fenótipo promovem angiogênese, remodelação e reparo de tecidos, regulação da imunidade e promoção tumoral (Mantovani, 2009). A polarização de macrófagos para o fenótipo M2 é induzida por IL-4 e IL-13 (Gurbuxani et al., 2001; Mytar et al., 1999).

3.3 A Imunologia do Câncer

As células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos e linfócitos estão presentes na maioria dos tumores sólidos. Estas células mediadoras das respostas inflamatórias são necessárias tanto para a progressão do tumor quanto para a eliminação deste (Maniati et al., 2010). Diversos estudos vêm ampliando o conceito de que a inflamação é um componente crítico de progressão tumoral (Zou et al., 2010). Estudos populacionais revelam que pacientes que mantêm um estado inflamatório crônico apresentam maior risco de desenvolver câncer (Karin et al., 2005). Além disso, estudos recentes têm mostrado o envolvimento da microglia/macrófagos na proliferação e malignidade do GBM (Zhai et al., 2011).

O papel da microglia e dos macrófagos na biologia de gliomas ainda estão pouco elucidados. Apesar de seu potencial citotóxico, essas células podem infiltrar significativamente na massa tumoral e parecem favorecer o crescimento do tumor e não a sua erradicação. Uma vez que as células do GBM são imunogênicas e secretam citocinas imunossupressoras (Badie et al., 2001), a ativação controlada da microglia e de sua propriedade antitumoral dentro do tumor pode fornecer uma arma adicional de defesa contra os tumores cerebrais.

Estudos relatam a importância da microglia no controle de tumores cerebrais (Kostianovsky et al., 2008). No entanto, essas células tornam-se hiporresponsivas no microambiente tumoral (Hussain.,2006) e um esforço importante na área da imunologia do câncer tem sido o de compreender como as células cancerosas conseguem desativar o sistema imunológico existente no local da origem do tumor (Blattman et al., 2004). Dessa forma, já que os mecanismos envolvidos ainda não foram completamente esclarecidos, uma melhor compreensão da relação imune com os tumores torna-se necessária.

Nas últimas décadas, o papel dos macrófagos no crescimento tumoral tem sido extensivamente estudado, embora os mecanismos que envolvem essas células na resposta imune contra os tumores permaneçam intrigantes e contraditórios. No microambiente tumoral, os macrófagos podem secretar certas substâncias que são capazes de estimular o crescimento neoplásico, dependendo do estágio e da natureza do tumor (Klimp et al., 2002; Shurin et

al., 2009). Após a migração dessas células mononucleares para os sítios neoplásicos, ocorrem mudanças nas suas propriedades tanto fenotípicas quanto genóticas (Shurin et al., 2009). Estudos indicam que após um primeiro momento onde ocorre o recrutamento das células do sistema imune para o sítio tumoral, elas são estimuladas a adquirir um fenótipo de ativação M2 levando a imunossupressão (Komohara et al., 2008) através de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 beta (IL-1 β) e o TNF- α (Zhang et al., 2011) e o aumento de citocinas imunossupressoras como o TGF- β 1, tanto por células de glioma como por macrófagos e microglia (Kiefer et al., 1994). Tais processos são importantes para a progressão dos gliomas, conforme apresentado na figura abaixo (Figura1).

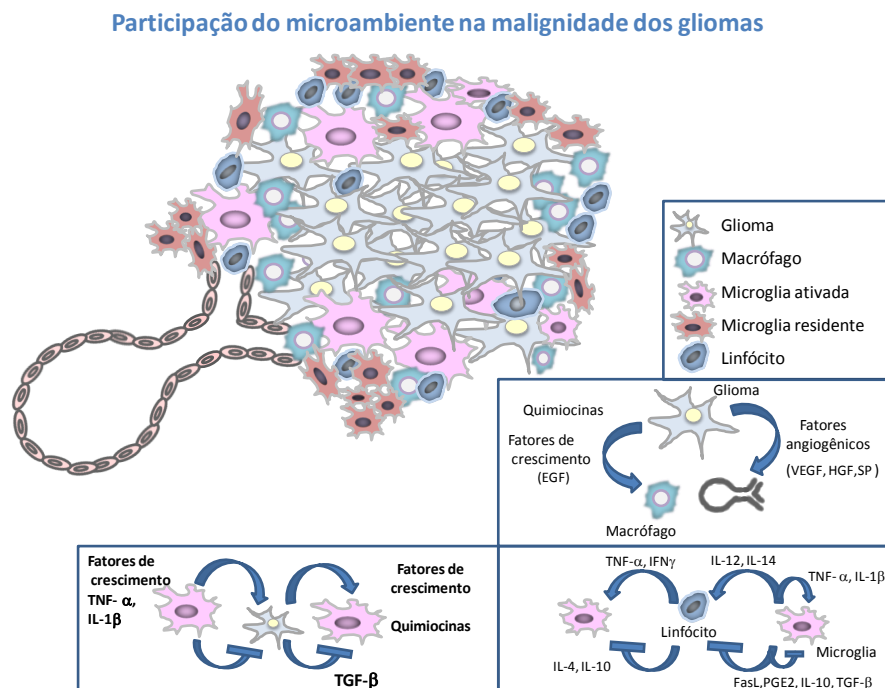


Figura 1: Participação do microambiente na malignidade dos gliomas. (Adaptado de Watters et al., 2005).

3.4 Sistema Purinérgico

O ATP (adenosina 5'- trifosfato) é um nucleotídeo é trifosfatado que, entre suas principais funções, está a de fornecer energia para as células dos organismos vivos (Jordan e Oster, 1948). Por décadas acreditou-se que esta fosse à única função do ATP (Burnstock, 2009). A história do sistema

purinérgico inicia em 1929, quando Drury e Szent-Gyorgi descrevem as potentes ações das purinas no coração e em vasos sanguíneos de cães (Drury e Szent-Gyorgyi, 1929). Atualmente, sabemos que os nucleotídeos também atuam como moléculas sinalizadoras do sistema purinérgico e estão envolvidas na regulação de vários processos fisiopatológicos no meio extracelular.

A sinalização purinérgica caracteriza-se pela atividade de purinas extracelulares (ATP, ADP e adenosina) e pirimidinas (UTP e UDP) como moléculas sinalizadoras, ela é uma rota de comunicação entre células e está envolvida em muitos mecanismos, incluindo eventos de curta e longa duração, como respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, proliferação e morte celular (Agteresch et al., 1999). Estas moléculas exercem seus efeitos por meio da interação com receptores de membrana específicos, denominados receptores purinérgicos ou purinoceptores (Burnstock, 2009).

São vários os mecanismos propostos para explicar a liberação dos nucleotídeos de adenina para o meio extracelular. O ATP pode atravessar a membrana quando a mesma está danificada, pode passar a membrana celular através de transportadores ou canais, como conexinas e hemicanais ou ser liberado por exocitose de vesículas sinápticas a partir de neurônios ou de astrócitos ou em grânulos intracelulares (células não-neuronais), ambos mediados por um mecanismo Ca^{2+} -dependente (Franke & Illes 2006).

Além disso, um importante fator que modula a resposta mediada por nucleotídeos via ativação dos seus respectivos receptores é o metabolismo extracelular dos mesmos pelas ectonucleotidases. As ectonucleotidases compreendem um grupo de enzimas que estão envolvidas na degradação de nucleotídeos e na formação de nucleosídeos, possuindo, portanto, um papel chave na regulação da sinalização purinérgica (Robson et al., 2006).

3.4.1 Receptores Purinérgicos

Receptores são proteínas de membrana que apresentam um sítio de ligação a um ou a uma classe de agonistas, permitindo a modificação de algum componente intracelular e a consequente sinalização. Isto é, os receptores são os pontos de entrada da informação na célula. Existem três grandes grupos de

receptores: (i) ionotrópicos - são receptores ligados a canais iônicos que quando ativados, permitem a passagem de íons; (ii) metabotrópicos - são receptores ligados à proteína G, uma proteína de membrana que pode regular a atividade de várias proteínas, como adenilil ciclase, fosfolipase C e (iii) receptores com atividade enzimática - nestes, a ligação do transmissor induz a uma atividade enzimática intracelular, geralmente a fosforilação em resíduos de tirosina (Alberts et al, 1997).

Após a liberação do nucleotídeo e/ou nucleosídeo para o meio extracelular, o mesmo irá interagir com seu respectivo receptor permitindo a continuação da cascata de sinalização purinérgica. Os receptores purinérgicos são divididos em dois grandes grupos, os receptores P1, que possuem como principal agonista endógeno a adenosina, e os receptores P2, sensíveis a nucleosídeos di- e trifosfato, como o ATP, ADP, UTP e UDP.

Os receptores do tipo P1, também chamados de receptores para adenosina, são divididos em quatro subtipos, A1, A2A, A2B e A3, e todos são acoplados a proteína G, porém, diferem na sua afinidade pela adenosina (Fredholm, et al., 2011). Os receptores A1 e A2A apresentam alta afinidade pela adenosina, enquanto que os receptores A2B e A3 são de baixa afinidade (Ribeiro et al., 2003). Os receptores A1 e A3 estão acoplados à proteína Gi ou Go, e sua ativação leva a um decréscimo dos níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPC), enquanto que os receptores A2A e A2B são acoplados à proteína Gs, o que resulta em aumento dos níveis intracelulares de AMPC (Ribeiro et al., 2002).

Os receptores P1 encontram-se amplamente distribuídos nas células, sendo expressos no coração, pulmão, fígado, testículos, músculo, medula espinhal, baço, intestino e cérebro (Burnstock, 2007). No sistema imune, estes receptores estão presentes na maioria das células e medeiam os efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios da adenosina (Di virgilio, 2007).

Já os receptores P2 dividem-se em duas categorias, P2X e P2Y. Os receptores P2Y são metabotrópicos acoplados a proteína G e os P2X são receptores ionotrópicos (Burnstock e Kennedy, 1985).

Os receptores P2X são divididos em sete subtipos (P2X1-7) que respondem ao ATP, enquanto que os receptores P2Y são subdivididos em oito subtipos (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11-14}) e podem ser ativados por ATP, ADP, UTP e UDP sendo

sensíveis também a nucleotídeos de açúcares, como UDP-glicose e UDP-galactose (North, 2002).

Os receptores P2X estão distribuídos em várias células do organismo como plaquetas, neurônios e células musculares (La sala et al., 2003). Dentre os diferentes subtipos de receptores P2X, destaca-se o P2X7, presente em mastócitos, linfócitos, macrófagos e células de Langerhans (Burnstock, 2007).

Os receptores P2Y foram encontrados em uma grande variedade de órgãos e tecidos: epitélio das vias aéreas, diferentes regiões do rim, no pâncreas, glândula adrenal, coração, endotélio vascular, pele, músculo e vários componentes do sistema nervoso, como córtex, hipocampo e cerebelo (Burnstock, 2006).

3.4.2 As Ectonucleotidases

Um fator importante que modula a resposta mediada por nucleotídeos é o metabolismo extracelular dos mesmos, catalisado pelas ectonucleotidases. Estas enzimas são responsáveis pela quantidade de nucleotídeos e dos seus respectivos nucleosídeos presentes no meio extracelular e, portando, controlam sua ligação com o receptor e seus efeitos. Essa família de enzimas incluem as ecto-nucleosídeo trifosfo-difosfohidrolase (E-NTPDases), as quais catalisam a degradação sequencial de ATP para ADP e AMP; as ecto-pirofosfato-fosfodiesterases- (E-NPP), que catalisam a hidrólise de ADP para AMP e de AMP para adenosina; as fosfatases alcalinas (ALP), que catalisam a degradação de ATP em ADP, ADP para AMP e de AMP para adenosina e por último a ecto-5'-nucleotidase (CD73), que catalisa a hidrólise de AMP para adenosina (Zimmermann, 2001).

As E-NTPDases constituem uma classe de enzimas associadas à membrana e hidrolisam nucleosídeos extracelulares tri e difosfatos na presença de íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Zimmermann et al., 1998). Até o momento, em vertebrados foram clonados e caracterizados oito membros denominados NTPDase1 a 8 (Robson et al., 2006). Essas enzimas possuem cinco regiões conservadas características de apirase (ACR1-5) e um ou dois domínios transmembrana (Zimmermann, 2001).

Os subtipos individuais das NTPDases realizam uma variedade de tarefas na célula e exibem diferentes localizações e especificidades: algumas residem na membrana plasmática, outras no complexo de Golgi, lisossomos, ou retículo endoplasmático. Além disso, apresentam preferências para substratos distintas (Zimmermann, 2001).

A NTPDase1 (CD39) hidrolisa igualmente bem ATP e ADP (1:1), enquanto que a NTPDase2 hidrolisa preferencialmente o ATP (30:1). As NTPDase3 e 8, apresentam preferência maior pelo substrato ATP em relação ao ADP (3:1 e 2:1, respectivamente) (Robson et al., 2006).

Quatro das NTPDases estão localizadas na superfície da célula com sítio catalítico voltado para o meio extracelular, sendo estas as NTPDases1,2,3 e 8, já as NTPDases5 e 6 apresentam localização intracelular, a primeira no retículo endoplasmático e a segunda o complexo de Golgi e tem preferências por nucleosídeos difosfatados. As NTPDases4 e 7 são enzimas intracelulares com sítios ativos voltados para o lúmen de organelas citoplasmáticas, porém a NTPDases4 está localizada no Complexo de Golgi e prefere UTP como substrato enquanto que a NTPDases7 prefere nucleosídeos trifosfatados e está localizada em vesículas extracelulares (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006; Lavoie et al., 2004).

As E-NPPs consistem em sete ectoenzimas que foram numeradas de acordo com sua ordem de descoberta. Apenas as três primeiras E-NPPs são capazes de hidrolisar nucleotídeos, incluindo o ATP e o ADP, sendo, portanto, relevantes na cascata de sinalização purinérgica (Goding et al., 2003).

A ecto-5'-nucleotidase (CD73) em associação à NTPDase, completa a hidrólise dos nucleotídeos, com a hidrólise do AMP até a produção de adenosina (Zimmermann, 1992). A ecto-5'-nucleotidase é uma glicoproteína ancorada a membrana plasmática por um resíduo de glicosilfosfatidil inositol (GPI), e ocorre essencialmente em todos os tecidos. Além da função catalítica, essa enzima está envolvida em interações célula-célula e célula-matriz (Zimmermann et al., 1998).

3.4.3 Sistema purinérgico e a resposta imune

O ATP, o ADP e a adenosina tem grande importância na modulação da resposta imune (Burnstock, 2009). Em condições normais, o ATP encontra-se praticamente todo no citoplasma celular (3-10 mM), enquanto que no compartimento extracelular os níveis são mantidos baixos (1-10 nM) (Di Virgilio, 2005). As concentrações extracelulares de ATP, bem como a de outros nucleotídeos, podem ser aumentadas em resposta a diferentes estímulos ou condições, tais como lise celular, hipóxia e inflamação (Lazarowski et al., 1997). O ATP quando em altas concentrações no meio extracelular pode ser interpretado como indicador de dano tecidual e então desencadear uma resposta inflamatória caracterizada por secreção de citocinas como IFN- γ (interferon gama), IL-12 e TNF (Langston et al., 2003).

Estudos indicam que células de glioma seriam responsáveis pela secreção de ATP no ambiente tumoral, que através da ligação no seu receptor P2X7 levaria a produção de quimiocinas como a proteína inflamatória de macrófagos -1a (MIP-1a) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e posterior recrutamento de macrófagos e microglia para o sítio tumoral (Jantaratnotai et al., 2009). A adenosina, a qual pode ser liberada como tal ou ser formada a partir da hidrólise do ATP, exerce no geral ações contrárias às do ATP extracelular (Bours et al., 2006). As concentrações de adenosina em situações homeostáticas variam entre 10 a 200 nM, enquanto que em situações de estresse seus níveis podem aumentar para 10 a 100 μ M (Fredholm, 2007). O aumento da concentração extracelular de adenosina ocorre em situações de isquemia, hipóxia ou trauma (Haskó et al., 2004). A adenosina age mediando uma resposta imunossupressora para proteger os tecidos adjacentes à inflamação dos ataques promovidos pelas células de defesa (Sitkovsky et al., 2005). Em macrófagos, a adenosina provoca a diminuição da produção de IL-12, uma potente citocina pró-inflamatória, e de IFN- γ , molécula central na ativação de macrófagos, além de estimular a produção de IL-10 (Haskó et al., 1998).

Monócitos e macrófagos possuem em sua superfície receptores P2X e P2Y, cujas expressões variam de acordo com o estágio de maturação celular e com o estímulo presente no ambiente. Quando os macrófagos sofrem ação do IFN-

γ , lipopolissacarídeo (LPS) ou TNF- α ocorre um aumento na expressão de receptores P2X7 que estimula a adesão celular ao endotélio vascular, etapa importante para a diapedese e para a produção de quimiocinas para monócitos. Além disso, o ATP extracelular em concentrações micromolares ao se ligar no receptor P2X7 é um importante estímulo para a produção de citocinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF- α . Porém, a ação de citocinas Th2 como IL-4, IL-10 diminui a expressão de receptores P2X7 em macrófagos (Humphreys et al., 1996).

3.7. Hipótese do estudo

Considerando a elevada malignidade dos gliomas, seu prognóstico extremamente pobre e seu desenvolvimento multifatorial intimamente ligado com o microambiente tumoral, estudos que visem mimetizar esse ambiente *in vitro* e compreender os mecanismos envolvidos na progressão desses tumores são necessários para o estabelecimento de estratégias de tratamento mais eficazes.

Um infiltrado inflamatório constituído de macrófagos é correlacionado com maior malignidade e um pior prognóstico para pacientes com glioma, já que essas células depois de recrutadas para o sítio tumoral são estimuladas a aumentar a secreção de fatores de crescimento, citocinas, supressores imunológicos e fatores angiogênicos visando à promoção tumoral (Wagner et al., 1999). Porém, os mecanismos presentes nesse processo ainda não estão completamente esclarecidos, dificultando uma intervenção e reversão deste quadro.

Além disso, já foi demonstrado que a sinalização purinérgica está envolvida em diversos processos fisiopatológicos, entre eles o câncer e a regulação da resposta imune. Células de gliomas apresentam baixas taxas de hidrólise de ATP e ADP quando comparados com astrócitos normais (Wink et al, 2003). Estudos demonstram que *in vivo* o ATP se acumula na periferia do tumor controlando a resposta inflamatória e levando a progressão tumoral (Braganhol, 2010).

Dessa forma, o sistema purinérgico e um infiltrado inflamatório estão envolvidos na progressão de tumores, porém não existem estudos que os

relacionem. Considerando o importante papel de ambos e a falta de esclarecimento sobre mecanismos de comunicação entre gliomas e macrófagos estudos que visem elucidar esses mecanismos se mostram necessários.

4 Materiais e Métodos

4.1. Cultivo da linhagem de glioma de camundongo GL261

A linhagem de glioma de camundongo C57BL/6 GL261 foi obtida da ATCC e cultivadas em meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% 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 macrófagos

Os macrófagos residentes peritoniais foram extraídos de camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade. Para a extração dos macrófagos foi feita uma injeção de 3 mL de DMEM gelado na cavidade peritoneal e em seguida, o abdômen foi gentilmente massageado e as células aspiradas e centrifugadas a 1000 g por 10 min, o pellet de células foi ressuspenso em DMEM. Após as células foram diluídas 10 vezes, contadas em microscópio ótico com o uso de câmara de newbauer e semeadas em placas de 48 poços (1x10⁵ macrófagos/poço). As células foram mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera umidificada com 5% CO₂ e, após um período de 30 minutos de aderência, os macrófagos foram lavados e submetidos ao tratamento com meio condicionado ou cocultivo com glioma GL261, conforme descrito abaixo. Após 24 h as análises foram realizadas.

4.3. Obtenção do meio condicionado (CM) de glioma GL261

Células de glioma GL261 foram primeiramente cultivadas em garrafas até alcançar a confluência de 90%. Após, as células foram tripsinizadas, contadas em microscópio ótico com o uso da câmara de newbauer e 6x10⁶ células foram semeadas em garrafas de 75 cm² em 15 mL de DMEM/10% SFB. As células foram posteriormente cultivadas por 3 dias até alcançar 90% de confluência. No terceiro dia pós-semeio, o meio foi retirado e substituído por meio

DMEM/10% SFB novo. Após 24 h, o meio condicionado de glioma GL261 foi coletado, centrifugado e congelado (-20°C) para posterior utilização.

4.4. Exposição dos macrófagos ao MC de glioma ou ao cocultivo com glioma GL261

Após 30 minutos necessários para adesão dos macrófagos (15×10^4 ou 10×10^4 células/poço para placas de 48 ou 96 poços, respectivamente), as culturas foram expostas ao MC de gliomas previamente preparado ou foram semeadas células de glioma GL261 diretamente sobre a monocamada de macrófagos (1×10^4 células de glioma GL261/poço; placa de 48 poços; 5×10^3 células de glioma GL261/poço; placa de 96 poços). Após tais procedimentos, os macrófagos foram mantidos em contato com o MC-glioma ou em condições de cocultivo durante 24 h. Culturas de glioma GL261 ou de macrófagos cultivados nas mesmas condições e isoladamente foram considerados controle.

4.5. Determinação da hidrólise de nucleotídeos

Para a determinação da hidrólise dos nucleotídeos, o meio de cultivo foi retirado e armazenado para análises posteriores, e as células foram lavadas duas vezes com meio de incubação livre de fosfato contendo 2 mM CaCl_2 , 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 à temperatura de 37°C até o momento das incubações. As incubações foram realizadas utilizando como substrato os nucleotídeos ATP, ADP e AMP (2 mM). Os meios de incubação foram adicionados de CaCl_2 para incubações com ATP e ADP, e MgCl_2 para incubações com AMP. As incubações aconteceram a 37°C, em banho-maria, por 10 min e foram interrompidas pela retirada de 150 μL do meio reacional e sua transferência a um tubo *ependorf* contendo 150 μL de ácido tricloroacético a 10% (TCA) previamente 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. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro com filtro para comprimento de onda a 630 nm e as absorbâncias das amostras foram comparadas com a curva padrão de Pi para estabelecimento de valores absolutos (Chan et al, 1986).

4.6. Tratamento dos cultivos celulares com ATP e determinação da proliferação celular pelo método da sulfarodamina B

Para a determinação da proliferação celular, 120 min após o cultivo as células foram tratadas com ATP (0.1 ou 1 mM) e 24 h após as células foram lavadas e fixadas em TCA- 50% por 45 min a 4°C. Após, as células foram lavadas cinco vezes com água destilada para a retirada total do reagente e então foi adicionada a solução de sulfarodamina B 0,4% em ácido acético seguido de uma incubação de 15 min para corar as proteínas. A solução foi retirada e foram efetuadas 5 lavagens dos poços com ácido acético a 1% para total retirada do corante não complexado com as proteínas. Por fim, o corante incorporado as células foi eluído com solução de Tris (10 mM). As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm.

4.7. Determinação da proteína

Para determinação da proteína foi adicionado 50 µL de solução de 1M NaOH e foram realizadas raspagens dos poços com a finalidade de lisar o conteúdo celular. Após foi feito um *pool* de 4 poços e 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 quantificadas em espectrofotômetro a 595 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 o *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 $P \leq 0,05$.

5 Resultados e discussão

5.1 Análise da hidrólise de ATP, ADP e AMP em cultura de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma.

O presente trabalho utilizou células de glioma GL261 e cultura primária de macrófagos em duas situações distintas – exposição dos macrófagos ao meio condicionado de glioma e cocultivo de gliomas e macrófagos, com o objetivo de mimetizar *in vitro* o complexo microambiente tumoral e, assim, melhor compreender os mecanismos envolvidos na progressão tumoral e a relação entre tumores cerebrais e macrófagos.

Inicialmente, avaliamos o impacto do cocultivo com gliomas e da exposição ao MC de gliomas sobre a atividade ATPásica de macrófagos. Conforme apresentado na Figura 2, podemos observar que ocorreu uma diminuição significativa de 45% na hidrólise de ATP quando os macrófagos e as células de glioma GL261 foram mantidos em cocultivo em comparação aos macrófagos cultivados isoladamente. Similarmente, a exposição dos macrófagos ao MC de gliomas, também promoveu uma diminuição significativa de 40% da atividade ATPásica (Figura 2). Além disso, podemos observar que a atividade de células de glioma GL261 é cerca de 70% menor quando comparada a atividade ATPásica dos macrófagos.

Células de gliomas apresentam baixas taxas de hidrólise de ATP e ADP quando comparados com astrócitos normais (Wink et al, 2003). O ATP acumula na periferia dos tumores por um conjunto de fatores, os quais incluem liberação desse nucleotídeo a partir das células tumorais, baixa atividade ATPásica das mesmas e a partir de extravasamento de células sadias que entrem em processo de necrose. A comunicação entre glioma e macrófagos e a consequente diminuição da hidrólise desse nucleotídeo tem diversas implicações. O ATP quando em altas concentrações no meio extracelular pode agir favorecendo o recrutamento de macrófagos e microglia para o sítio tumoral e desencadear uma resposta inflamatória com produção de diversas citocinas pró-inflamatórias (Langston et al, 2003). Como citado anteriormente, um ambiente inflamatório é correlacionado positivamente com a malignidade em

gliomas (Morimura et al., 1990). Além disso, o acúmulo de ATP no microambiente tumoral leva a progressão tumoral e a utilização de enzimas removedoras de ATP, como a apirase, são capazes de reverter o crescimento dos gliomas, bem como de diminuir o infiltrado inflamatório associado ao tumor (Morrone et al, 2003).

Gliomas apresentam resistência à morte induzida por altas concentrações de ATP (Morrone *et al.*, 2005). No entanto, em células normais isso não ocorre, portanto o possível acúmulo de ATP pode resultar em morte de células saudáveis da periferia do tumor, abrindo assim espaço para invasão no tecido sadio periférico.

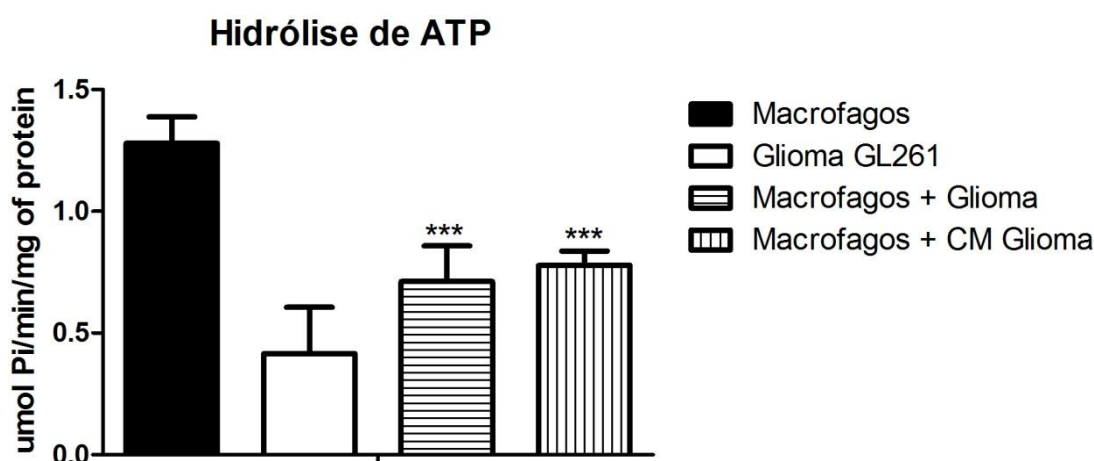


Figura 2. Análise da hidrólise de ATP em cultura de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma GL261. A atividade ATPásica foi avaliada pelo método do verde de malaquita. Dados representam médias \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey-Kramer . ***diferença significativa quando comparado com o grupo macrófagos ($P \leq 0,05$).

Em relação à hidrólise do ADP, podemos observar uma diminuição significativa de cerca de 40% na atividade ADPásica quando os macrófagos foram mantidos em cocultivo com o glioma GL261 (Figura 3). Porém, não foi observada diferença significativa quando as células foram expostas ao meio condicionado de glioma, indicando a importância do contato célula-célula para regulação da via. Além disso, as células quando em cocultivo hidrolisaram ATP e ADP em uma razão semelhantes, não demonstrando preferência entre os

substratos portando indicando que a NTPDase1 (CD39) pode ser a responsável pela hidrólise dos nucleotídeos observada.

O possível acúmulo de ADP causado pela diminuição da hidrólise de ATP e ADP observado no cocultivo também pode estar agindo em benefício do tumor. Estudos demonstram que o ADP está envolvido via ativação das células endoteliais através de receptores purinérgicos P2Y₂ levando a um aumento da formação de metástases e da malignidade tumoral (Schumacher et al., 2013). O AMP ainda tem seus efeitos pouco estudados, no entanto foi demonstrado que ele apresenta potencial citotóxico para células de glioma (Bavaresco, et al., 2008), então a diminuição da via que observamos neste trabalho no cocultivo também pode estar atuando visando a proteção contra essa citotoxicidade causada pelo AMP.

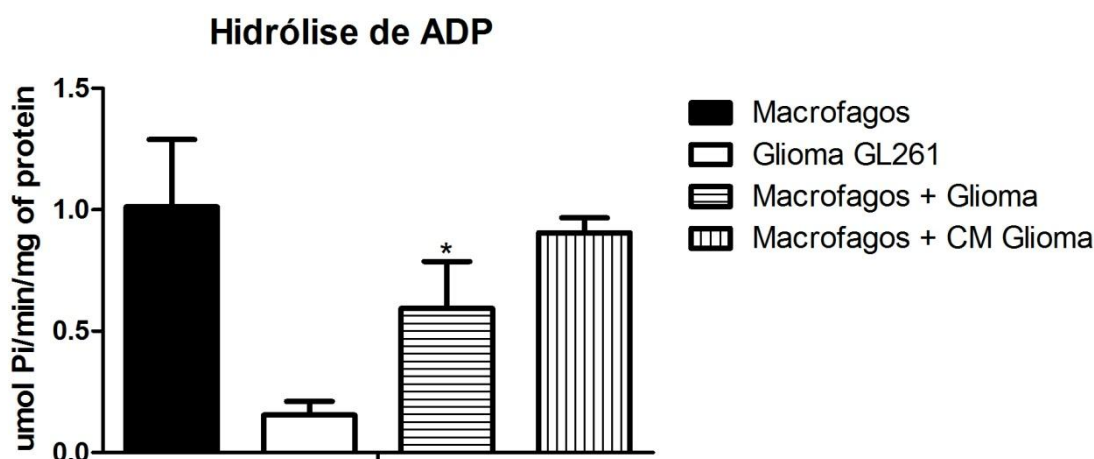


Figura 3. Análise da hidrólise de ADP em cultura de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma GL261. A atividade ADPásica foi avaliada pelo método do verde de malaquita. Dados representam médias \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey-Kramer. *diferença significativa quando comparado com o grupo macrófagos ($P \leq 0,05$).

Em relação à hidrólise do AMP, os resultados mostram uma diminuição significativa de aproximadamente 40% na sua hidrólise quando macrófagos e glioma foram mantidos em regime de cocultivo, Já quando a cultura de macrófago foi tratada com meio condicionado de glioma não foi observado diferença significativa na hidrólise apesar de ocorrer uma tendência (Figura 4).

Além ser liberada como tal, via transportadores específicos, a adenosina no meio extracelular pode ser resultante da degradação extracelular do ATP por ação das ectonucleotidases, considerando que a degradação do ATP, ADP e AMP está diminuída no cocultivo, os efeitos imunossupressores causados pela ligação da adenosina aos seus receptores também podem estar reduzidos.

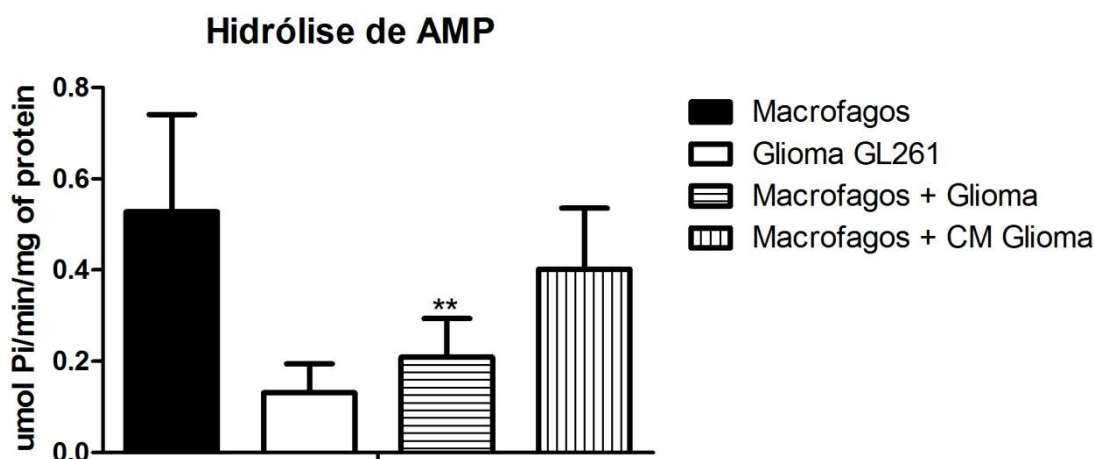


Figura 4. Análise da hidrólise de AMP em cultura de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma GL261. A atividade AMPásica foi avaliada pelo método do verde de malaquita. Dados representam médias \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey-Kramer. **diferença significativa quando comparado com o grupo macrófagos ($P \leq 0,05$).

5.2 Análise do efeito do ATP sobre a proliferação de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma GL261.

Nossos resultados apresentados anteriormente indicam uma diminuição da hidrólise de ATP em cultura de macrófagos cocultivadas com glioma GL261, sugerindo um acúmulo do mesmo no meio extracelular. Sendo assim, o próximo passo do trabalho foi avaliar o efeito do mesmo sobre a proliferação destas células.

Considerando que a ativação de receptor P2X7 está relacionada tanto com ativação de macrófagos como com proliferação celular, as concentrações do agonista ATP (0,1 e 1 mM) foram escolhidas com o objetivo de ativar o referido

purinireceptor. Após um período de tratamento com ATP de 24 h podemos observar um aumento significativo da proliferação apenas quando células de macrófagos e de gliomas foram mantidas em modelo de cocultivo. Especificamente, ocorreu um aumento de 33% quando comparado à cultura de macrófago isolada e de 36% quando comparado as células de glioma GL261 nas duas concentrações testadas (0,1 e 1 mM) (Figura 5).

Estudos mostraram que linhagem de glioma GL261 se mostra suscetível ao dano causado pelo ATP extracelular quando as mesmas foram expostas a concentrações milimolar desse nucleotídeo, mesmo comportamento observado em culturas primárias de glioblastomas de pacientes (Tamajusuku, 2010). Então, a resistência à morte ao ATP e o estímulo proliferativo causado por esse nucleotídeo *in vivo* pode ser devido à interação com outras células, como os macrófagos, conforme foi observado nos resultados apresentados na Figura 5.

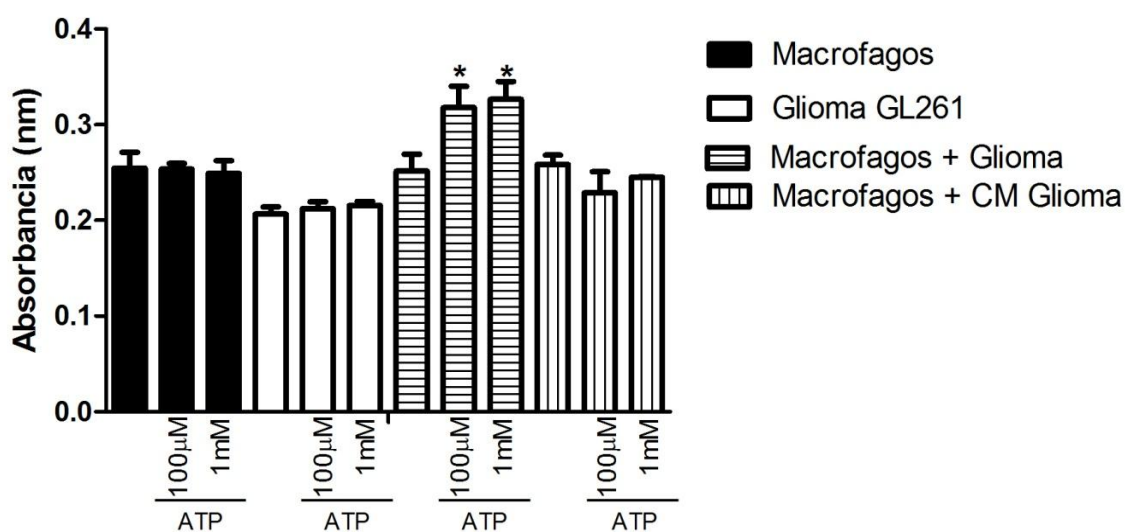


Figura 5. Análise da proliferação em cultura de macrófagos cocultivados com glioma GL261 ou expostos ao meio condicionado de glioma GL261 após tratamento com ATP. A proliferação foi avaliada pelo método de sulfarodamina B. Dados representam médias \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey-Kramer. *diferença significativa quando comparado com o grupo macrófagos, glioma GL261 e macrófagos em cocultivo com glioma GL261 ($P \leq 0,05$).

6 Conclusão

Nossos resultados sugerem um novo mecanismo envolvido na relação entre gliomas e macrófagos, mostrando que o sistema purinérgico está envolvido nessa comunicação e na proliferação de gliomas, indicando um novo alvo terapêutico para aumentar o sucesso de imunoterapias. Porém, outros experimentos são necessários para elucidar outros mecanismos envolvidos e suas implicações.

7 Referências

- Abbas, AK, Lichtman AH, Pober, J. Cellular and Molecular Immunology - Saunders Company, 4 a edição, USA, 2001.
- Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. **Drugs**. v. 58, p. 211-232, 1999.
- Alberts et al. Biologia Molecular da Célula, 3a Ed. Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.
- Badie B, Schartner J. Role of microglia in glioma biology. **Microsc. Res. Tech**, v. 54, p. 106–113, 2001.
- Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A, Battastini AM. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. **Mol Cell Biochem**. v. 319, p. 61-8, 2008.
- Blattman JN, Greenberg P. D .Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. **Science**, v. 305, p. 200–205. 2004.
- Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol Ther**. v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.
- 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, Huppel 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.
- Braganhol, E. Sistema purinérgico e a progressão dos gliomas: avaliação de parâmetros proliferativos e inflamatórios. 2010. Tese doutorado em Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- Burger PC, Cohen KJ, Rosenblum MK, Tihan T. Pathology of diencephalic astrocytomas. **Pediatr Neurosurg**, v. 32, n.4, p. 214-9., 2000.
- Burnstock G. Purinergic signalling: past, present and future. **Braz J Med Biol Res**. v.42, n.1, p.3-8. 2009.

Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev.** V. 87, n. 2, p. 659-797, 2007.

Burnstock G. Purinergic signalling. **British Journal of Pharmacology.** v. 147, n. 1, p.172-181, 2006.

Burnstock, G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? **Gen Pharmacol.** v.16, n.5, p.433-40. 1985.

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

Di Virgilio F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling.** v. 1, p. 205–209, 2005.

Di virgilio F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. **Purinergic Signaling.** V. 3, n. 1-2, p. 1-3, 2007.

Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **J Physiol.** v.68, n.3, p.213-37, 1929.

Franke H, Illes, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. **Pharmacology & therapeutics.** v. 109, n. 3, p. 297-324, 2006.

Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death Differ.** v. 14, p. 1315-1323, 2007.

Goding JW, Grobben B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. **Biochim Biophys Acta.** v. 20, p. 1-19, 2003.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology.** v. 3, p. 23-25, 2003. Gurbuxani E, Solary B, Chauffert F, Martin. Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system, **J. Immunol.** v. 167, p. 5077-5083, 2001.

Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol.** v. 25, n. 1, p. 33-39, 2004.

Hasko G, Nemeth ZH, Vizi ES, Salzman AL, Szabo C. An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferongamma production and prevents lethality in endotoxemic mice. **Eur J Pharmacol.** v. 358, n.3, p. 261-268, 1998.

Holland EC. Progenitor cells and glioma formation. **Curr Opin Neurol**, v.14, n6, p.683-8. 2001.

Huang Z, Cheng L, Guryanova OA, Wu Q, Bao S. Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. **Protein Cell**, v. 1, n. 7, p. 638-55, 2010.

Hume D A, Ross I L, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. **J LeukocBiol.** v. 72, p. 621–627, 2002.

Hume D A. The mononuclear phagocyte system. **Current Opinion in Immunology.** v. 18, p. 49-53, 2006.

Humphreys BD, Virginio C, Surprenant A, Rice J, Dubyak GR. Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. **Molecular Pharmacology**, v. 54, n. 1, p. 22-32, 1998.

Hussain SF, Yang D, Suki D, Grimm E, Heimberger AB. Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients. **J. Transl.Med.** v. 4, p. 15, 2006.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. 2013. Rio de Janeiro: Inca, 2011. 16-2-2013.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. 2013.

Jantaratnotai N, Choi HB. ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells. **BMC Cancer**, n. 9, p. 442, 2009.

Jordan WK, Oster G. On the Nature of the Interaction Between Actomyosin and ATP. **Science.** v.108, n.2799, p.188-90. 1948.

Karin M, Greten FR. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v.5, p. 749–759, 2005.

Kiefer R, Supler ML, Toyka KV, Streit WJ. In situ detection of transforming growth factor- β mRNA in experimental rat glioma and reactive glial cells. **.Neuroscience Letters**, v. 166, n. 2, p. 161–164, 1994.

Kleihues P, Ohgaki H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. **Toxicol Pathol.**, v. 28, n.1, p. 164-70, 2000.

Kleihues P, Sobin LH. World Health Organization classification of tumors. **Cancer**, v. 88, n.12, p. 2887, 2002.

Klimp AH, De vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in oncology/Hematology**. v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. **Journal of Pathology**, v. 216, n. 1, p. 15–24, 2008.

Kostianovsky AM, Maier LM, Anderson RC, Bruce JN, Anderson DE. Astrocytic regulation of human monocytic/microglial activation. **J Immunol**, v. 181, n. 8, p. 5425–32, 2008.

La Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **J.Leukoc.Biol**. v.73. p.339-343, 2003.

Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA. Secretion of IL2 and INF γ , but not IL4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **The Journal of Immunology**. v.170, p.2962-2970, 2003.

Lavoie EG, Kukulski F, Le´vesque SA, Lecka J, Sevigny J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. **Biochem Pharmacol**. v. 67, p. 1917-1926, 2004.

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.

Lazarowski ER, Homolya L, Boucher RC, Harden TK. Identification of an ecto-nucleoside diphosphokinase and its contribution to interconversion of P2 receptor agonists. **J Biol Chem**. v. 272, n. 33, p. 20402–20407, 1997.

Lefranc F, Brotchi J, Kiss R: Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. **J Clin Oncol**, v. 23, p. 2411-2422, 2005.

Lind D S. Arginine Metabolism: Enzymology, Nutrition, and Clinical Significance. **J. Nutr Bethesda**, v. 134, p. 2837S-2841S, 2004.

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.

Maniati E, Soper R, Hagemann T. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. **Oncogene**, v. 29, n. 42, p. 5653-5662, 2010.

Mantovani A. Orchestration of macrophage polarization. **Blood**. v. 114, p. 3135-3136, 2009.

Morimura T, Neuchrist C, Kitz K, Budka H, Scheiner O, Kraft D. Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. **Acta Neuropathol.** v. 80, n. 3, p. 287 - 94, 1990.

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, Rodnigh 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.

Mrugala MM. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. **Discov Med**, v. 15, n 83, p. 221-30, 2013.

Mytar B, Siedlar M, Wolosyn M, Ruggiero I, Pryjama J, Zembala M. Induction of reactive oxygen inter-mediate in human monocytes by tumor cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. **Br. J.Cancer**. v. 79, p. 737-743, 1999.

Newlands, E.S. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treat Rev**, v. 23, n. 1, p. 35-61, 1997.

North RA. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol Rev**. V. 82, p.1013-1067, 2002.

Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG, Sarkaria JN, Markert JM, Darley-Usmar VM, Bailey SM, Gillespie GY, Landar A, Griguer CE. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. **J Biol Chem**, v. 285, p. 39759–39767, 2010.

Ribeiro J A, Sebastião A M, Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: Pathophysiological implications. **Pog. Neurobiol.** V. 68, p. 377-392, 2002.

Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. **Drug News Perspect.** v. 16, n. 2, p. 80-6. 2003.

Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic. Signal.** v. 2, p. 409-30, 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.

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.

Shurin MR, Salter RD. Dendritic cells in Cancer. **1a. Ed. Springer**, 2009.

Siebzehnruhl FA, Reynolds BA, Vescovi A, Steindler DA, Deleyrolle LP. The origins of glioma: E Pluribus Unum? **.REV. GLIA**, v. 59, p. 1135–1147, 2011.

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.

Sitkovsky MV, Ohta A. The “danger” sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors?. **Trends Immunol.** v. 26, n. 6, p. 299-304, 2005. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, Van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide *versus* radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-Year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncol**, , v, 10, p. 459–466, 2009.

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.

Tamajusuku AS, Villodre ES, Paulus R, Coutinho-Silva R, Battastini AM, Wink MR, Lenz G. Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. **J Cell Biochem**, v. 1 n.5, p. 983-91, 2010.

Thompson ,thompson – genetic medical.7 ° ed capitulo 16 389-390p.

Van Ginderachter JA , Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the Best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology**. v. 211, p. 487-501, 2006.

Ventura MA, Thomopoulos P. ADP and ATP activate distinct signaling pathways in human promonocytic U-937 cells differentiated with 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Molecular Pharmacology**, v. 47,n. 1, p. 104-114, 1995.

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.

Wagner S, Czub S, Greif M, Vince GH, Suss N, Kerkau S, Rieckmann P, Roggendorf W, Roosen K, Tonn JC. Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas.. **Int J Cancer**. v. 82, n. 1, p. 12-6, 1999.

Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. **N. Engl. J. Med.** v. 359, p. 492–507, 2008.

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

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, p. 1431-1433, 1990. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **The Biochemical journal**. v. 336, p. 1-17, 1998.

Yamanaka R, Saya H. Molecularly targeted therapies for glioma. **Ann Neurol** , v. 66, n. 6, p. 717-729, 2009.

Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Murata H, Hatae R, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T. Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. **Front Oncol**, v. 2, p. 186, 2012.

Zhai H, Heppner FL, Tsirka SE. Microglia/macrophages promote glioma progression. **Glia**, v. 59, p. 472–85, 2011.

Zhang L, Liu W, Alizadeh D. S100B attenuates microglia activation in gliomas: possible role of STAT3 pathway. **GLIA**, v. 59, n. 3, p. 486–498, 2011.

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

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

Zimmermann, H., Braun, N., Kegel, B., Heine, P. New Insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International**. v. 32, p. 421-425, 1998.

Zimmermann, H. Signalling via ATP in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 17, n.10, p. 420-426, 1994.

Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 4, p. 248-256, 2010.