

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

Interação astrócito-glioma na promoção de fatores de malignidade tumoral

Carlus Augustu Tavares do Couto

Pelotas, 2015

Carlus Augustu Tavares do Couto

Interação astrócito-glioma na promoção de fatores de malignidade tumoral

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

Orientadora: Profa. Elizandra Braganhol, Dra.

Co-Orientadora: Profa. Roselia Maria Spanevello, Dra.

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C871i Couto, Carlu Augustu Tavares do

Interação astrócito-glioma na promoção de fatores de malignidade tumoral / Carlu Augustu Tavares do Couto ; Elizandra Braganhol, orientadora ; Roselia Maria Spanevello, coorientadora. — Pelotas, 2015.

76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Astrócitos. 2. Sinalização purinérgica. 3. Glioma C6. 4. INOS. 5. Ectonucleotidases. I. Braganhol, Elizandra, orient. II. Spanevello, Roselia Maria, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Carlus Augustu Tavares do Couto

Interação astrócito-glioma na promoção de fatores de malignidade tumoral

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:

18/12/2015

Banca examinadora:

Elizandra Braganhol

Profa. Dra. Elizandra Braganhol (Orientador)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Ethel Antunes Wilhelm

Profa. Dra. Ethel Antunes Wilhelm
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Fabiano B. Carvalho

Dr. Fabiano Barbosa Carvalho
Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Dedico

ao benefício de muitos seres,
em especial os seres em intenso sofrimento.

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. 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 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 recebido e ainda por 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 e sugestões com seu tradicional “Táá!”. Por ter me oferecido momentos de muito desenvolvimento racional. 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 pelo 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 satisfazer as minhas necessidades básicas de café. Por ter estado

sempre perto no último ano de mestrado e por confiar na minha capacidade para desenvolver diversas atividades.

À Francieli, pela confiança, pelo carinho, pelos desabafos e por estar disposta a discutir sobre tudo.

Aos colegas de laboratório pelo suporte técnico ao longo dessa jornada, pelos momentos de alegria, e por serem quem são. Em especial a Gabriela Debom pelo suporte técnico e emocional ao longo de todas as etapas desse trabalho.

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.

“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. **Interação astrócito-glioma na promoção de fatores de malignidade tumoral.** 2015. 75f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção)- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Glioblastoma multiforme é um tumor maligno e alta capacidade proliferativa no sistema nervoso central. Vários aspectos celulares e moleculares têm sido descritos como marcadores de malignidade e suas implicações são avaliadas como fatores prognósticos, mas não há nenhum sistema in vitro que simula o microambiente tumoral adequadamente. Nós avaliamos a liberação de IL-6 e IL-10, atividade da iNOS, SOD e CAT, conteúdo de TBARS e atividades ATPásica, ADPásic e AMPásic em astrócitos, células de glioma C6 e condições de cocultivo. Este estudo mostra que os astrócitos cocultivados com células de glioma C6 não sofrem morte celular induzida, sofrem alteração morfológica para um formato estrelado característico de células ativas sem a superexpressão de GFAP e vários marcadores de alta malignidade foram expressos. Verificou-se que o modelo de cocultivo induziu uma diminuição na atividade da CAT para 10% da actividade normal de astrócitos. Todos os outros marcadores avaliados aparecem significativamente aumentados quando comparada com os astrócitos não cocultivados. Nossos resultados sugerem que a comunicação astrócitos-glioma é um fator chave importante para a indução de um microambiente tumoral favorável que suporta o crescimento tumoral, capacidade de invasão e evasão do sistema imunológico.

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

Abstract

DOCOUTO, Carlus Augustu Tavares. **Astrocyte-glioma interaction promoting tumor malignancy factors**. 2015. 75f. Dissertation (Masters degree in Biochemistry and Bioprospection) - Graduate Program in Biochemistry and Bioprospection, Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

Glioblastoma multiforme is a high malignant and proliferative tumor in central nervous system. Several cellular and molecular aspects have been described as malignancy factor and its implications are evaluated as prognostic factor but there is no in vitro system that emulates the tumor microenvironment properly. We evaluate IL-6 and IL-10 release, iNOS, SOD and CAT activity, TBARS content and ATPasic, ADPasic and AMPasic activities on astrocytes, C6-glioma cells and coculture conditions. This study shows that astrocytes cocultured with C6-glioma cells do not suffer induced cell death, it's morphology alters to a active format without GFAP overexpression and several high malignant markers was expressed. We found that the coculture model induces a decrease on CAT to 10% of normal astrocyte activity and all others markers that we evaluate appears to be significantly increased when compared to astrocytes non cocultivated. Our results suggest that astrocytes-glioma cross-talk is an important key factor for inducing a favourable tumor microenvironment that supports tumor growth, invasiveness and immune system evasion.

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

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema das teorias da origem dos gliomas.....	21
Figura 2: Presença do astrócito no SNC	26
Figura 3: Esquema geral da hidrólise de ATP.	29
Figura 4: Sinalização intracelular via sensibilização do receptor da IL-6	32

Lista de abreviaturas e siglas

ADA	Adenosina deaminase
Ado	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
COX	Ciclo-oxigenase
Ecto-5'-NT/CD73	Ecto-5'-nucleotidase
EGFRvIII	Receptor do fator de crescimento endotelial variação 3
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GBM	Glioblastoma multiforme
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
mRNA	RNA mensageiro
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
(E-) NPP	(ecto-) nucleosídeo pirofosfatase-fosfodiesterase

(E-) NTPDase	(ecto-) nucleosídeo trifosfo-difosfo-hidrolase
OMS	Organização mundial da saúde
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
UDP	Uracila difosfato
UTP	Uracila trifosfato
wtEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial normal

Sumário

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
PARTE II.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1. GLIOMAS.....	20
3.1.1. TEORIAS SOBRE A ORIGEM DOS GLIOMAS	20
3.1.2. CLASSIFICAÇÃO DOS GLIOMAS.....	20
3.1.2.1. QUANTO AO TIPO CELULAR.....	22
3.1.2.2. QUANTO A LOCALIZAÇÃO	22
3.1.2.3. ESTADIAMENTO QUANTO A MALIGNIDADE	22
3.1.3. GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM).....	23
3.1.4. TRATAMENTO DOS GLIOMAS	24
3.2. MICROAMBIENTE TUMORAL	24
3.2.1. ASTRÓCITOS.....	25
3.2.2. SISTEMA PURINÉRGICO	27
3.2.2.1. PURINORECEPTORES.....	28
3.2.2.2. ECTONUCLEOTIDASES.....	29
3.2.3. INTERLEUCINA 6 (IL-6).....	31
3.2.4. ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA.....	32
3.2.5. ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO	34
3.3. HIPÓTESE DO TRABALHO.....	35
PARTE III.....	34
4. MANUSCRITO	35
PARTE IV	65
5. CONCLUSÃO	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

Parte II

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 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, anaplasia (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. Evidências apontam para a necessidade de um microambiente tumoral inflamatório, o qual 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 co-cultivos 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, co-cultivo 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 de alguns fatores inflamatórios e associados à inflamação em culturas primárias de astrócitos corticais de ratos cocultivadas com glioma C6.

2.2. Objetivos específicos

Utilizando o modelo de cocultivo de glioma C6 e astrócitos, analisar os seguintes parâmetros relacionados à malignidade tumoral:

- Liberação de IL-6 e IL-10 e expressão de GFAP;
- Atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS); - Atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT);
- Perfil de peroxidação lipídica de astrócitos submetidos ao cocultivo com células de glioma C6;
- Atividade hidrolítica de enzimas do sistema purinérgico sobre nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP).

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 que são originados por diferenciação celular normal (Figura 1A), e que estariam sujeitas a mutações genéticas em oncogenes, e dessa forma se desencadearia o processo de formação tumoral (Figura 1B) (Lipton e Rosenberg, 1994; Paulus e Tonn, 1995). A segunda dessas teorias defende que os gliomas são originados de células progenitoras neurais que sofreram mutação e conseqüente transformação oncogênica, dessa forma tornando-se células iniciadoras tumorais (Figura 1C) (Singh *et al.*, 2004; Piccirillo e Vescovi, 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 todos esses fatores característicos de células de gliomas (Capper *et al.*, 2009). 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, Alvarez-Buylla e Berger, 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 realizados de forma isolada ou em combinação (Louis *et al.*, 2007).

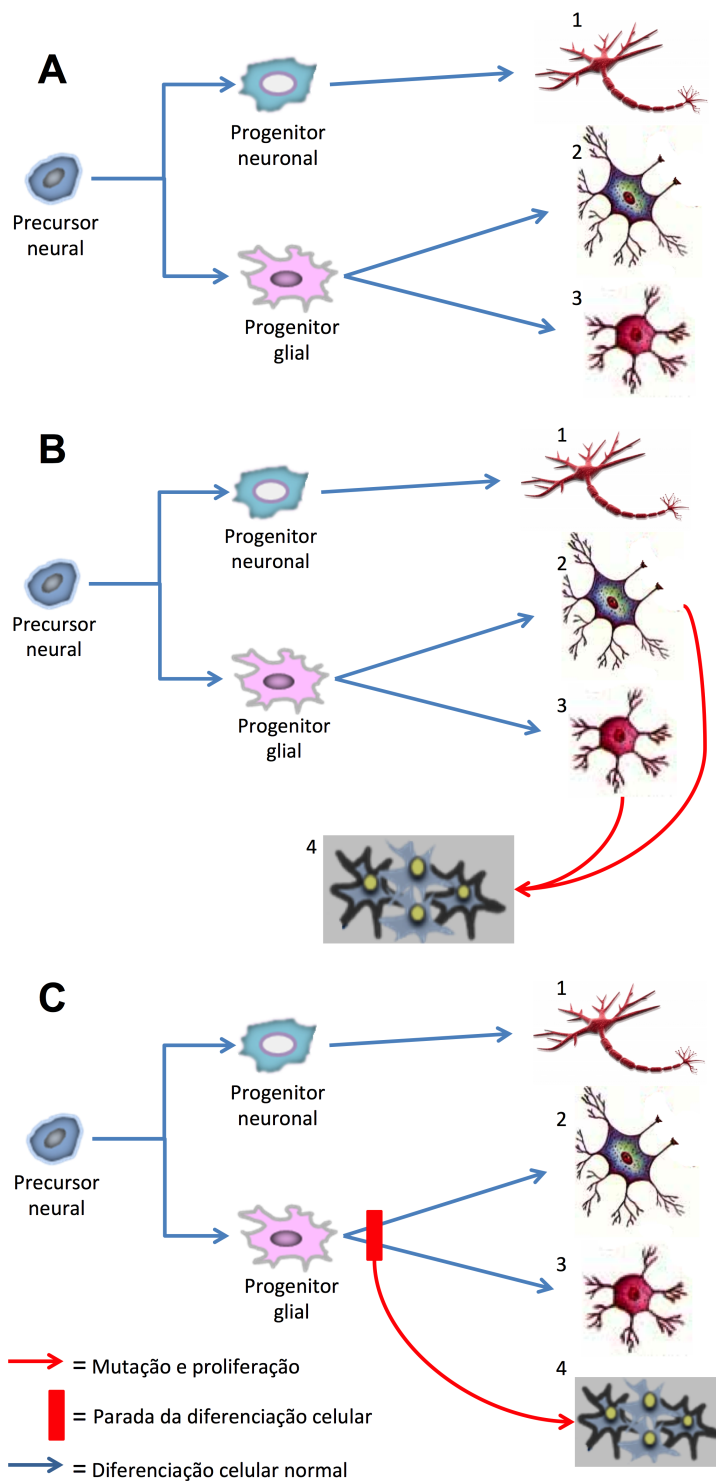


Figura 1: Esquema das teorias da origem dos gliomas. (A) Diferenciação celular normal, (B) teoria da mutação *non-sense* em células maduras, (C) teoria da mutação de células imaturas que aguardam por estímulo para proliferação.

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 (Capper *et al.*, 2009).

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

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, Weber e Scheufler, 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 presença de necrose. A OMS observa a classificação dos gliomas em quatro níveis crescentes de malignidade, de I a IV (Chintala, Tonn e Rao, 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 anaplastia (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 podem 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; Vredenburg *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 (Sathornsumetee *et al.*, 2008; Sathornsumetee e Rich, 2008). Além disso, possuem 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 e incrementam 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). Além disso, o tecido cerebral no entorno do GBM apresenta uma resposta inflamatória, constituída de ativação de macrófagos, astrogliose reativa, invasão vascular e formação de edema, a qual pode estar relacionada ao aumento de malignidade (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 estratégia 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, Pasetto e Monfardini, 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).

3.2.1. 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, 1995; Zhang e Barres, 2010). 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; Zhang e Barres, 2010). Os astrócitos compõem 50% do volume cerebral e constituem 90% do número total de células cerebrais (Privat, 1995; Zhang e Barres, 2010).

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 Katz, 1985). 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, 1995).

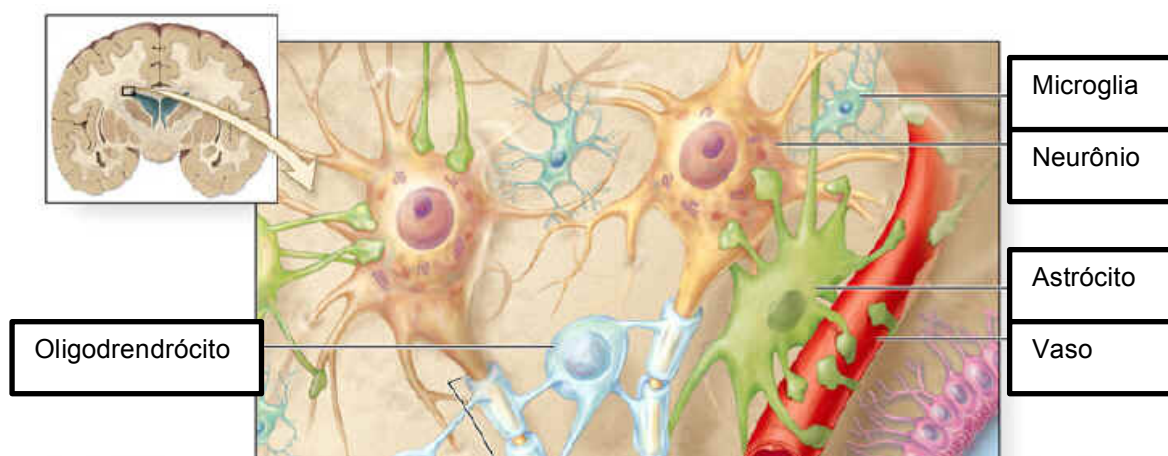


Figura 2: Presença do astrócito no SNC (Adaptado de (Zhang e Barres, 2010).

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 e Katz, 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 (astroglíose 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; Araque *et al.*, 2014).

É importante ressaltar a importância que os astrócitos vêm tomando na neurociência, 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; Araque *et al.*, 2014).

3.2.2. 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 ideia da 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 patológicos através da sensibilização dos chamados purinoreceptores e do controle dessa sensibilização por enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos e formação de nucleosídeos no meio extracelular, as ectonucleotidases (Burnstock, 2009b).

3.2.2.1. 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 por nucleosídeos tri e di-fosfatos (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: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃.

Já os receptores P2X são receptores ativados exclusivamente pelo ATP e são ionotrópicos, ou seja, ligados a canais iônicos. Eles apresentam permeabilidade para íons Na⁺, K⁺ e Ca⁺², dessa forma executam respostas celulares rápidas. Os receptores P2X são classificados em sete sub-tipos (P2X1-7) de acordo com a afinidade que apresentam pelo ligante ATP (Abbracchio e Ceruti, 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 e Ceruti, 2006).

3.2.2.2. Ectonucleotidasas

As ectonucleotidasas 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, Neuneier e Grothmann, 2001).

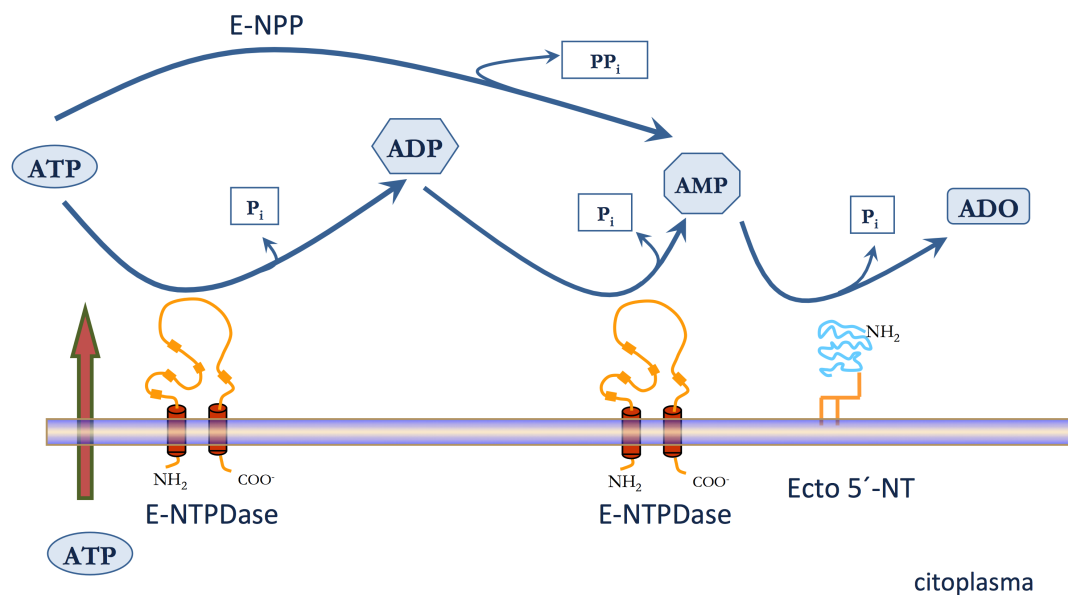


Figura 3: Esquema geral da hidrólise do ATP. O ATP presente no ambiente extracelular é hidrolisado por enzimas ancoradas na membrana celular gerando, ao fim, adenosina (adaptado de (Burnstock, 2009a).

As E-NTPDases são enzimas que hidrolisam ATP a ADP e ADP a AMP, além de outros nucleosídeos tri- e difosfatados. Esse sub-grupo possui como características comuns a presença de cinco sítios conservados em sua estrutura, denominados de Regiões Conservadas da Apirase (ACR), a

necessidade de cátions divalentes (Mg^{+2} e Ca^{+2}) como cofatores enzimáticos, 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, Seigny e Zimmermann, 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, Seigny e Zimmermann, 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 SNC, regulando a neurogênese (Robson, Seigny e Zimmermann, 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 (Kaczmarek *et al.*, 1996; Kegel *et al.*, 1997; Chadwick e Frischauf, 1998; Heine *et al.*, 1999; Bigonnesse *et al.*, 2004).

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.

3.2.3. Interleucina 6 (IL-6)

Interleucinas são importantes fatores que modulam tanto processos inflamatórios crônicos quanto agudos. Desde sua descoberta diversas moléculas sinalizadoras vem sendo isoladas e caracterizadas em diferentes contextos, tanto fisiológicos quanto patológicos e desempenham inúmeros papéis, muitos deles aparentemente contraditórios (Turner *et al.*, 2014). No âmbito oncológico, a IL-6 assume um papel importante na promoção de um microambiente tumoral pro-inflamatório característico do GBM.

Tem sido demonstrado que pacientes que possuem altas concentrações de IL-6 sistêmica e peritumoral, apresentam, proporcionalmente, piores prognósticos, menores índices de sobrevida bem como maior edema peritumoral (Chang *et al.*, 2005). Altas concentrações de IL-6 também são relacionadas com aumento de IL-10, que embora seja uma citocina com efeitos contrários aos da IL-6, complementa um papel pro-tumoral agindo na inibição da proliferação de células T, induz apoptose em células T auxiliares e proporciona um acúmulo de células T reguladoras (Wei *et al.*, 2010). Todos esses efeitos na modulação da resposta imune foram relatados com a ativação de vias dependentes de STAT3 (Figura 4) (Wu *et al.*, 2010).

A IL-6 apresenta outras formas de indução de malignidade, como por exemplo através da via do receptor do fator de crescimento endotelial (EGFR). Estudos tem relatado que GBM apresentam grandes quantidades de EGFR, que respondem a IL-6 e levam a ativação da via da STAT3. Entretanto, alguns GBM ainda apresentam uma forma oncogênica desse receptor o EGFRvIII (variação 3 do EGFR) que é permanentemente ativo e conseqüentemente leva a liberação massiva de IL-6 no ambiente tumoral. Essa alta liberação faz com que a IL-6 sensibilize os EGFR normais (wtEGFR) e induzam malignidade em células normais, proporcionando um crescimento ainda maior, não dependendo apenas da proliferação de células tumorais (Nitta *et al.*, 2010). Nesse sentido, também pela ativação do EGFRvIII, diversos fatores dependentes de sinalização por STAT3 serão traduzidos e liberados no ambiente tumoral, sendo um dos principais fatores a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Puram *et al.*, 2012).

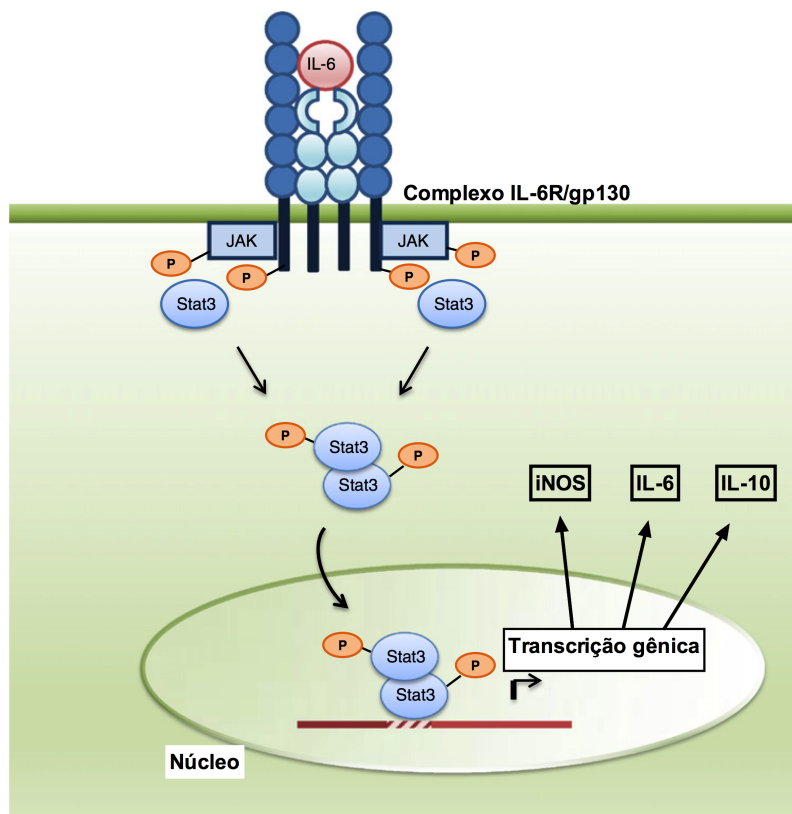


Figura 4: Sinalização intracelular via sensibilização do receptor da IL-6. IL-6 sensibiliza seus receptores que fosforilam STAT3, estes se dimerizam e agem em promotores específicos levando a expressão de alguns genes (adaptado de (Turner *et al.*, 2014).

3.2.4. 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 como nos astrócitos, macrófagos e células endoteliais (Yang *et al.*, 2002). Esse efeito pleiotrópico permite que esse sinalizador atue na vasodilatação, neurotransmissão e citotoxicidade de macrófagos (Yang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2014). Em condições patológicas, ele ainda apresenta atividade na morte de bactérias e na degeneração neuronal (Yang *et al.*, 2002). No SNC, a produção de NO está associada à 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 endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS) (Bakshi *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2014), tais enzimas são isoenzimas embora não sejam isoproteínas sendo 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, Hwang e Snyder, 1990; Forstermann, Schmidt, *et al.*, 1991).

Outro aspecto discriminador da iNOS com a nNOS e a eNOS é o fato de que os monômeros desta se ligarem fortemente à calmodulina, de forma que a atividade da iNOS é pouco dependente da concentração citoplasmática de cálcio (Bredt e Snyder, 1990; Forstermann, Pollock, *et al.*, 1991; 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; Andrade, Hart e Piper, 1992; Farias-Eisner *et al.*, 1994). 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).

3.2.5. Estresse oxidativo

Estresse oxidativo é o nome dado ao desequilíbrio entre as defesas oxidantes e as espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas espécies reativas são formadas em condições fisiológicas e são precursoras ou consequências de reações vitais para a manutenção da homeostase celular de organismos aeróbios. As concentrações intracelulares das ROS são controladas por diversas enzimas, sendo as principais a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT)(Calabrese *et al.*, 2007).

Em condições patológicas pode ocorrer o estresse oxidativo e a exacerbação de um reagente intermediário da cascata de reações podendo levar a diversos danos celulares, incluindo danos ao DNA e peroxidação lipídica levando a instabilidade de membrana comprometendo a homeostase celular e podendo desencadear processos inflamatórios e necróticos no tecido adjacente. Esses processos podem ativar vias de sinalização responsáveis pela migração de células do sistema imune, através, por exemplo, de receptores do tipo TOLL(Kostourou *et al.*, 2011).

A SOD é a primeira enzima da cascata e se encontra principalmente em duas isoformas uma mitocondrial e outra citosólica. São proteínas codificadas por genes diferentes e se utilizam de cofatores metálicos diferentes para efetuar a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (Brunelli, Yermilov e Beckman, 2001). Essa dismutação, embora ocorra de forma natural, sem a necessidade de catalizador enzimático, em condições biológicas necessita de catalisador uma vez que a velocidade de reação do ânion superóxido com outros compostos é maior que a velocidade de dismutação dele em gás oxigênio, um exemplo de reação é com o NO, formando peroxinitrito um agente tóxico e relacionado com diversas alterações celulares em quadros patológicos(Koken *et al.*, 2004).

Outra enzima muito importante nesse processo é a CAT, que por sua vez utiliza o substrato da SOD, o peróxido de hidrogênio, formando gás oxigênio e água como produtos finais (Carballal, Bartesaghi e Radi, 2014). Uma vez que o peróxido de hidrogênio é tóxico para a célula e pode desencadear diversos processos inflamatórios quando extrapola para o ambiente extracelular, ele precisa ser rapidamente neutralizado para uma forma inócua (Koken *et al.*, 2004). Uma molécula de CAT é capaz de catalisar a decomposição de 40.000.000 de moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo sendo a enzima principal na desintoxicação desse composto. Um exemplo de presença da catalase é em bactérias patogênicas que possuem catalase na parede celular para evadir o sistema imune do hospedeiro que utiliza peróxido de hidrogênio no combate á infecções bacterianas (Carballal, Bartesaghi e Radi, 2014).

Alterações na metabolização de espécies reativas de oxigênio vem sendo relatadas como fatores de risco em diversas patologias como a síndrome de down, a esclerose lateral amiotrófica, a depressão maior e alguns tipos tumorais (Carballal, Bartesaghi e Radi, 2014; Cao *et al.*, 2015).

3.3. 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 da 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 SNC, 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 *et al.*, 2007; Kostourou *et al.*, 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 *et al.*, 2007). Ainda, quando em condições de estresse nitrosativo, o NO leva a um aumento na atividade das enzimas cicloxigenases (COX), de cujas reações resultam inevitavelmente radicais livres, tornando ainda mais grave o quadro de neuroinflamação (Kostourou *et al.*, 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.

Parte III

4. Manuscrito

Todos os resultados e discussões desse trabalho serão apresentados na forma de artigo.

Glioma-Astrocyte cross-talk induces cancer-related inflammation factors

doCouto C.A.T.¹, Debom G.¹, Azambuja J.H.¹, Tavares R.G.¹, Zanotto-Filho A.²,
Moreira J.C.F.², de Souza A.C.G.³; Cimarosti H.³; Stefanello F.M.¹, Spanevello
R.M.¹, Braganhol E.^{4*}

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

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

³Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

*Corresponding Author

Elizandra Braganhol (ebraganhol@ufcspa.edu.br)

Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DCBS)-UFCSPA

Rua Sarmiento Leite, 245 – Prédio Principal- sala 304

CEP: 90.050-170

Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: +55 51 3303 8762

Abstract

Glioblastoma multiforme is a high malignant and proliferative tumor from central nervous system. Several cellular and molecular aspects have been described as malignancy factors and its implications are evaluated as prognostic factor but there is no *in vitro* system that emulates the tumor microenvironment properly. We evaluate IL-6 and IL-10 release, iNOS, superoxide dismutase and catalase activities, TBARS content and ATPasic, ADPasic and AMPasic activities on astrocytes, C6-glioma cells and coculture conditions. This study shows that astrocytes cocultured with C6-glioma cells do not suffer induced cell death, it's morphology alters to a active format without GFAP overexpression and several high malignant markers were expressed. We found that the coculture model induces a decrease on catalase activity to 10% of normal astrocyte activity and all others markers that we evaluated appears to be significantly increased when compared to control astrocytes. Our results suggest that astrocyte-glioma cross-talk is an important key factor for inducing a favourable tumor microenvironment that supports tumor growth, invasiveness and immune system evasion.

Key words: astrocyte, gliomas, ATP, oxidative stress, iNOS, cytokines

1. Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary brain tumor (Maher e Raffel, 2004; Preusser, Haberler e Hainfellner, 2006; Dunn, Dunn e Curry, 2007; Yin *et al.*, 2007), characterized by high clinical and histological heterogeneity, which results in a very poor prognosis for patients (Stupp *et al.*, 2005). Despite intensive treatments, GBM remains incurable and the median survival for patients remains at approximately 12 months (Stupp *et al.*, 2006; Louis *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2007).

A number of genetic alterations of genes related to cell death, proliferation and differentiation control have been described in GBM (Brennan *et al.*, 2009). However, it is becoming clear that only the genetic alterations do not guarantee the GBM development and point that a microenvironment composed by non-transformed cells and its secretion products plays an important role in controlling the course of tumorigenesis (Skog *et al.*, 2008). Indeed, the tumor-associated parenchymal cells, including glial cells provide a specialized niche that favor cancer cell invasion and angiogenesis (Charles *et al.*, 2011). Although astrocytes are the most abundant cell type in the mammalian brain, comprising 90% of the cells from CNS (Privat, 1995; Zhang e Barres, 2010), little is known about its contribution to GBM progression.

Although historically astrocytes have been studied as a homogeneous group of cells, it is becoming clear that they exhibit high functional and plasticity variability in the CNS biochemistry (Haydon, 2001). They are involved in a variety of functions including the maintenance of ion homeostasis, blood-brain barrier, synapse formation, and neurotransmitter turnover (Zhang e Barres, 2010). Astrocytes also differ in their response to injury and disease, where they

may be converted into a reactive phenotype. The astrocyte activation, or astrogliosis, plays a central role in basically all types of brain injuries, including tumors, and it is characterized by a sequence of events including increased expression levels of intermediate filaments such as GFAP; expression of cytokines and, in severe activation, astrocytes become proliferative and form a scar (Babcock *et al.*, 2003; Buffo *et al.*, 2008; Sofroniew, 2009). Moreover, evidence point that the glioma microenvironment may promote the astrocyte activation which in turn may secrete a variety of factors that modulates the tumor behavior (Rath *et al.*, 2015).

In the context of cancer-related inflammation, a number of inflammatory molecules that compose the glioma microenvironment including nucleotides, e.g. ATP, ROS, cytokines and others have been identified as positive modulators of astrocyte activation (Wilson, 1997; Kang e Hebert, 2011; Rodrigues, Tome e Cunha, 2015). In CNS, ATP is stored in synaptic and astrocytes vesicles and mediates a variety of biological effects including induction of astrogliosis and inflammation control via activation of purinergic receptors which are widespread expressed in both neuronal, non-neuronal and also in cancer cells (Burnstock, 2008). Alterations on purinergic signaling are related to GBM progression (Morrone *et al.*, 2003; Morrone *et al.*, 2006; Braganhol *et al.*, 2009). Studies suggest that extracellular ATP induces *in vivo* glioma growth (Morrone *et al.*, 2006) and controls the release of IL-8 and MCP-1 by glioma cells *in vitro* (Braganhol *et al.*, 2015). Oxidative injury is another component implicated in cancer progression. Indeed, studies have identified iNOS as a regulator of glial transformation, being important to gliomagenesis (Skog *et al.*, 2008; Jahani-Asl e Bonni, 2013). Nitric oxide (NO) results in the

formation of peroxynitrite which inhibits p53 in GBM (Toda, Ayajiki e Okamura, 2009) and induces cell proliferation and tumor growth (Calabrese *et al.*, 2007; Kostourou *et al.*, 2011; Jahani-Asl e Bonni, 2013). Finally, the production of cytokines by cancer and adjacent cells is component essential to cancer development. For example, IL-6 has been related to increased migration, invasiveness and glioma heterogeneity (Jin *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012), while IL-10 contributes to recruitment of T regulatory cells, which further contribute to immune escape of gliomas (Rolle, Sengupta e Lesniak, 2012).

Considering that astrocytes are multifunctional cells that reacts to insults and that the relationship between non-transformed astrocytes and gliomas cells remains unclear, here, by using the direct cocultive technique of gliomas and astrocytes, we addressed the role of some important parameters to cancer progression, including cytokine production, oxidative stress and purinergic signaling. The results showed here give new insights into how astrocyte-glioma crosstalk may contribute to cancer-related inflammation and progression.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fungizone, penicillin/streptomycin, 0.25% trypsin/ EDTA solution, fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Nucleotides (ATP, ADP, AMP) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Cytokine kits were provided by R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

2.2 General cell culture procedures

2.2.1 C6 glioma cell line cultures

C6 rat glioma cell line was obtained from the ATCC (American Type Cell Collection; Rockville, Maryland, USA). Cells at 10–20 passages were grown in culture flasks and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (pH 7.4) containing 1% DMEM (Gibco BRL), 8.4 mM HEPES, 23.8 mM NaHCO₃, 0.1% fungizone, penicillin/streptomycin 0.5 U/mL and supplemented with 5% (v/ v) FBS. Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air.

2.2.2 Primary astrocyte culture and astrocyte-glioma cell coculture procedures

Astrocyte cultures were prepared as previously described (Da Frola *et al.*, 2009). Briefly, cortex of newborn Wistar rats (1-2 days old) were removed and dissociated mechanically in a Ca⁺² and Mg⁺² free balanced salt solution (CMF), pH 7.4, (137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.27 mM Na₂HPO₄, 1.1 mM KH₂PO₄, and 6.1 mM glucose). After centrifugation at 1000 g for 10 min, the pellet was suspended in DMEM supplemented with 10% FBS. The cells (2 x 10⁵) were seeded in poly-L-lysine-coated 24-multiwell plates. After 4h seeding, plates were gently shaken and phosphate-buffered saline (PBS)-washed and medium was changed to remove neuron and microglia contaminants. Cultures were allowed to grow to confluence by 20–25 days. Medium was replaced every 4 days. Following astrocyte maturation, 1x10⁴ C6 glioma cells were seeded onto astrocyte monolayers in a 24-multiwell plate. The cocultures were maintained in DMEM/10% FBS for 48 h. C6 glioma or astrocytes cultured isolated under the same conditions were applied as control. All procedures used in the present

study followed the “Principles of Laboratory Animal Care” of the National Institutes of Health and were approved by the Ethical Committee of UFPel (protocol number 10321).

2.3 Cell viability and staining

2.3.1 MTT analysis

For measuring total cell viability we performed MTT test, which evaluate mitochondrial activity by reducing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to its insoluble formazan, which has a purple color. After 48 h of coculture, cells were incubate cell with MTT solution for 1.4 hours, after this time, solutions were removed and plates were left to dry. Formazan crystals were diluted in DMSO and absorbance was read at 540 nm.

2.3.2 May-Grunwald-Giemsa

After 48 h of coculture, cells were fixed with 10% TCA. Once dried, cells were incubated for 5 minutes with May Grunwald reagent (New Prov, 01909) followed by Giemsa solution (New Prov, 01908) incubation for 20 min. Finally, cells were washed with abundant water and dried in a dark clean place.

2.3.3 Sulfarodamina-B

After coculture, cells has been fixed with 10% TCA. Once dried, cells were incubated with 0.4% SRB solution (0.4% sulfarodamina-B in 1% acetic acid in water) for 20 min. Then cells have been washed 10 times with 1% acetic acid and plates were placed in dark clean place.

2.3.4 Propidium iodide assay

After coculture procedures, the culture media was replaced and cells were exposed to propidium iodide (PI) (7.5 μ M) for 1 h before taking pictures using an

inverted microscope (Olympus IX71, Japan) fitted with a standard rhodamine filter (515-560 nm). Images were captured using a digital camera connected to the microscope.

2.4 GFAP Western Blot

Cells were lysed in Tris-HCl 50 mmol/L (pH 7.5), NaCl 150 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Triton X-100 1%, sodium dodecyl sulfate 0.1%, protease inhibitor 1%, and NEM 20 mmol/L. Protein concentrations were determined and the samples were boiled for 5 min at 95°C with 5% β -mercaptoethanol and 2% glycerol. Western blot analysis was performed as described in (Hoppe *et al.*, 2013) using a rabbit anti-GFAP antibody (ABCAM, ab7260).

2.5 Cytokine release determination

IL-6 and IL-10 secreted by astrocytes, C6 glioma cells or astrocyte-glioma cocultures were quantified in the conditioned media of these cells by rat IL-6 or IL-10 DuoSet (R&D Systems, DY-506 and DY-522, respectively), following the manufacturers' instructions. Rat recombinant IL-6 or IL-10 was used as a standard. Results were expressed as pg of cytokine per mL.

2.6 Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity determination

iNOS activity was estimated by Greiss reaction. Briefly, 50 μ L of culture supernatant was added to 50 μ L of sulphanilamide solution (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid) and the mixture was incubated in the dark at room temperature. Following 15 min, 50 μ L of NED (0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride) solution was added and 10 min later the absorbance was

determined in a spectrophotometer at 540 nm. Nitrite concentrations were estimated using sodium nitrite curve as standard. The protein concentration was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976). Results were expressed as μM nitrite per mg of protein.

2.7 Formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

The lipid peroxidation was measured by TBARS method (Esterbauer e Cheeseman, 1990). Briefly, the cell homogenates were gently mixed with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid then heated to 100°C for 25 min. The quantification was based on staining intensity using a spectrophotometer at 535 nm. Results were expressed as nmol of TBARS per mg of protein.

2.8 Catalase assay (CAT)

CAT activity was assayed in cell cultures according to Aebi method (Aebi, 1984) based on the decomposition of H_2O_2 monitored at 240 nm at room temperature. One CAT unit is defined as one μmol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity was expressed as units of CAT per mg of protein.

2.9 Superoxide dismutase assay (SOD)

The total SOD activity was measured by the method of Misra and Fridovich (Misra e Fridovich, 1972). This method is based on the superoxide inhibition dependent of adrenaline auto oxidation. The assay is quantified using a

spectrophotometer at 480 nm. The specific activity of SOD was expressed as units per mg of protein.

2.9 Ectonucleotidase activity determination

The ATP, ADP and AMP hydrolysis was determined in 24-multiwell plates containing astrocytes, C6 glioma cells or astrocyte-glioma cocultures. The reaction was started by the addition of 200 μ L of the incubation medium containing 2 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES (pH 7.4) and 3 mM of ATP or ADP at 37°C. For AMP hydrolysis, the same incubation medium was used with the exception that 2 mM MgCl₂ was used instead of CaCl₂ and the final nucleotide concentration was 1mM. Following 10 min incubation the reaction was stopped by removing an aliquot of the incubation medium and transferring it to a pre-chilled tube containing TCA (5% w/v).The release of inorganic phosphate (Pi) was measured by the malachite green method (Chan, Delfert e Junger, 1986) with KH₂PO₄ as a Pi standard. Specific activity was measured as nmol Pi released per min per mg of protein, data was expressed as percentage of astrocytes hydrolysis.

2.11 Landscape analysis of inflammatory, oxidative stress and purinergic signaling gene/protein interaction networks in gliomas.

Gene/protein-association network analysis of gene expression was constructed by associating different pathways related to increased glioma malignity. Briefly, the network is generated using STRING database with input options 'databases', 'experiments', 'textmining' and 0.700 confidence level. STRING integrates different curate and public databases containing information on direct

and indirect functional protein–protein associations/interactions. Each protein is identified according to both HUGO Gene Symbol and Ensembl Peptide ID. The selected gene list is applied in the STRING database and the links (interaction strength) between two different genes are saved in data files, which were handled in the Medusa software.

2.12 Statistical analysis

Data were analyzed in triplicate using the sixth version of the software GraphPad Prism. All analyzes were performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni test. Difference between mean values were considered significant when $P \leq 0.05$. Data were presented as mean \pm S.E.M.

3. Results

3.1 Astrocyte and astrocyte-glioma coculture analysis

We performed two different staining processes to evaluate the culture morphology and in both of them it was observed the stellar form of astrocytes when submitted to coculture with C6 glioma cell (Fig. 1, panels B, F, H), when compared to single astrocytes that presents a lozenge shape (Fig. 1, panels A, E, G). To evaluate the culture viability during the coculture, we perform MTT for generic mitochondrial activity (Fig. 1I) and we found the same pattern of absorbance for astrocytes and cocultured cells. Cell viability was also analyzed by PI staining, and no significant cell death was found in single astrocytes or cocultured astrocytes (Fig. 1, panels C and D). To prove that the cultured cells were astrocytes the presence of GFAP has been evaluated on culture homogenates (Fig. 1J) by WB. As expected, astrocytes expressed high GFAP

levels which were not modified by coculture with C6 glioma. In contrast, minimal GFAP expression was found in C6 glioma cells.

3.2 Interleukins quantification

In order to evaluate the IL-6 and IL-10 release by cultured cells the ELISA assay was performed (Fig. 2). We found that C6-glioma cells and astrocytes exhibit the same pattern of IL-6 and IL-10 liberation. However, at coculture conditions, the IL-6 liberation was 9.3-fold higher than astrocytes ($p=0.0042$) and 10.35-fold higher than C6-glioma cells ($p=0.0052$) cultivated alone (Fig. 2A). For IL-10, it was observed an increase of 13-fold when compared to astrocytes ($p=0.0233$) and 12.25-fold when compared to C6-glioma cells ($p=0.0415$) (Fig. 2B).

3.3 Oxidative stress parameters

In sequence some oxidative stress parameters have been evaluated. First, we evaluated the iNOS activity using the Greiss method as described in material and methods. We found that C6-glioma cells have a natural 6-fold higher liberation of NO to supernatant when compared to astrocytes ($p<0.0001$). At coculture conditions, NO accumulation was 17.4-fold and 2.9-fold higher when compared to astrocytes ($p<0.0001$) or C6-glioma cells ($p=0.0012$) cultivated alone, respectively (Fig. 3A).

Superoxide dismutase activity was found to be 45% higher in cocultured cells than in astrocytes ($p<0.0001$), the same pattern was found in C6-glioma cells, which has shown a 42% higher activity than astrocytes ($p<0.0001$). C6-glioma cells and cocultured cells had the same SOD profile (Figure 3B). Catalase

activity was decreased in 91% and 86% in cocultured cells when compared to astrocytes ($p < 0.0001$) or C6-glioma cells ($p < 0.0012$) cultivated alone, respectively. Astrocytes and C6-glioma cells has no difference on CAT activity ($p < 0.0723$) (Fig. 3C). Lipidic peroxidation was measured using TBARS method, and it has been found that coculture condition exhibited an increase of 1.98-fold TBA level when compared to astrocytes ($p < 0.0003$) and a decrease of 33.25% TBA levels in comparison to C6-glioma cells ($p < 0.0003$). C6-glioma cells has a 2.97-fold higher TBA level when compared to astrocytes ($p < 0.0001$) (Fig. 3D).

3.4 Adenine nucleotide hydrolysis profiles

The NTPDase and ecto-5'-NT/CD73 activity profile on astrocyte, C6-glioma and in cocultive were determined by malaquite green method (Fig.4). ATP hydrolysis was increased by 143% and 318% in coculture conditions when compared to astrocytes ($p < 0.0001$) or to C6-glioma cells ($p < 0.0001$), respectively. In according to previous publications (Wink *et al.*, 2003), astrocytes and C6-glioma cells also exhibit differential ATPase activity. C6-glioma cells had 41.7% less ATPase activity in comparison to astrocytes ($p = 0.0497$) (Fig. 4A). ADP hydrolysis present the same profile, once coculture condition show an increase of 54% when compared to astrocytes ($p = 0.0171$), and 300% increase when compared to C6-glioma cells ($p = 0.0015$). As in ATPase activity, C6-glioma cells have a minor hydrolysis rate, 62% less then astrocytes alone ($p = 0.0118$) (Fig. 4B). AMPase rates of both astrocytes and C6-glioma controls were equals, and coculture condition promoted an increase of 4-fold AMP hydrolysis ($p < 0.0001$), which is consistent with the protumor role of ecto-5'-NT (Fig. 4C).

4. Discussion

The present work demonstrates the participation of astrocytes in glioma malignance *in vitro*. First we evaluated the impact of glioma-astrocyte coculture on astrogliosis reactive. Indeed, at coculture conditions the GFAP expression was not altered but alterations on astrocyte morphology and a dramatic increase of IL-6 and IL-10 release, important cytokines involved on tumor progression, has been found. We further demonstrate that the presence of astrocytes plus glioma cells modulated stress oxidative parameters. Notably, the activity of iNOS was greatly increased in glioma-astrocyte coculture. Finally, the ectonucleotidase activity was increased at coculture conditions, which suggest an increase on extracellular adenosine leading to IL-6 and IL-10 release, characterizing a positive feedback also justifying the stellar morphology of the cocultured cells (Abe e Saito, 1998).

Glioblastoma multiforme is a high malignant cerebral tumor and its progression has been associated to an inflammatory environment (Hara e Okayasu, 2004; Louis *et al.*, 2007; Tafani *et al.*, 2011). In this context, IL-6 release and iNOS overexpression impact different signalling pathways related to tumor progression and malignancy (Ishimaru *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Our results showed that the glioma-astrocyte cocultivation increased IL-6 and IL-10 release and iNOS expression. Studies have shown that IL-6 promotes IL-10 and iNOS overexpression in a positive feedback through TLR4-STAT3 signalling pathway (Chen *et al.*, 2008; Nitta *et al.*, 2010; Puram *et al.*, 2012; Griesinger *et al.*, 2015). IL-6 has been described as GBM prognostic factor related to reduced survival and increased perifocal edema (Chang *et al.*, 2005). We also found that SOD activity has been increased and CAT has been

almost inactivated, which may characterize a mechanism to protect the cell and the microenvironment from the peroxynitrite formation, once SOD increase reduces superoxide concentration, and CAT may conjugate to NO (Brunelli, Yermilov e Beckman, 2001) blocking or, at least, reducing the substrate availability to peroxynitrite formation. The increase of SOD activity may be a consequence of IL-10 signalling (Koken *et al.*, 2004), it's concentration appears elevated probably as a consequence of both IL-6 signalling (Wu *et al.*, 2010). Also, increased SOD activity elevates NO half-life and biological activity (Carballal, Bartesaghi e Radi, 2014), probably justifying the catalase blockade. All these findings supports an increase of H₂O₂ concentration, and it's consequences may contribute to a positive feedback on IL-6 liberation, iNOS expression (Cao *et al.*, 2015) and increased membrane damage (increased TBARS) with consequent membrane instability and leakage of intracellular contents, which may includes ATP and TLR-4 endogenous ligands.

ATP and ADP hydrolysis profile has been significantly increased by the coculture treatment, this modulation may be a consequence of increased ATP concentrations on the extracellular medium leading to an overexpression of NTPDase2 (Brisevac *et al.*, 2015). The same study have shown that extracellular ATP also up-regulates ecto-5'-NT expression and activity, explaining the 4-fold AMP hydrolysis that we found. Based on the purinergic signalling cascade activity we can assume an adenosine accumulation causing an immunosuppressive environment and IL-10 release by A_{2A} receptors sensitization (Panther *et al.*, 2001; Panther *et al.*, 2003; Vincenzi *et al.*, 2013). ATP via a P2Y₂ signalling induces IL-6 liberation (Douillet *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2015), through P2Y activation up-regulates IL-6 production

induced by LPS (Ishimaru *et al.*, 2014). ATP appears to modulate IL-6 release based on a JAK2/STAT3 autocrine loop pathway (Bustamante *et al.*, 2014). The overexpression of ecto-5'-NT is a key factor for glioma progression (Ludwig *et al.*, 1999) and its inhibition leads to reduction of tumor cells proliferation *in vitro* (Bavaresco *et al.*, 2008). Ecto-5'-NT have a close relation with extracellular matrix, consequently when high expressed leads to a extracellular and intracellular signalling pathways based on adenosine sensitizing receptor (Cappellari *et al.*, 2012), specially A3 receptor, that induces both increased MPP-9 expression (Gessi *et al.*, 2010) and antiapoptotic effect (Taliani *et al.*, 2010).

Bringing our findings to a clinical approach, iNOS expression is related to high malignancy (Cobbs *et al.*, 1995), invasiveness (Puram *et al.*, 2012), and neovascularization through VEGF expression (Hara e Okayasu, 2004). IL-6 production is a key prognostic factor which is related to reduced survival rates, it is also connected to T cell inactivation, T cell apoptosis and induction of T regulatory cells, based on IL-6/STAT3/IL-10 axis (Wei *et al.*, 2010). In EGFRv3 positive tumours, we have an important role for IL-6, once EGFRv3 is permanently active, IL-6 is permanently liberated, sensitizing normal EGFR in normal cells inducing malignancy and consequent tumor proliferation (Nitta *et al.*, 2010; Puram *et al.*, 2012).

In conclusion, our data suggest the active astrocyte participation in the creation and maintenance of a favourable microenvironment to glioma growth. Alterations in astrocyte morphology and in parameters related to inflammatory response as IL-6/IL-10 release, modulation of oxidative stress and purinergic parameters may be associated to increased glioma malignancy (Fig. 5). Although

more studies are necessary to better understand the mechanisms involved in these effects, the role of astrocytes on GBM progression may be considered in the development of new anti-glioma therapeutic strategies.

5. Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

6. Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Universal Processo 482055/2013-8); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Dr. Couto C.A.T., Debom G., Azambuja J.H. were recipients of CNPq or CAPES fellowship.

7. References

- [1] C. O. Maher and C. Raffel, "Neurosurgical treatment of brain tumors in children," *Pediatr Clin North Am*, vol. 51, pp. 327-57, Apr 2004.
- [2] M. Preusser, C. Haberler, and J. A. Hainfellner, "Malignant glioma: neuropathology and neurobiology," *Wien Med Wochenschr*, vol. 156, pp. 332-7, Jun 2006.
- [3] L. T. Yin, Y. J. Fu, Q. L. Xu, J. Yang, Z. L. Liu, A. H. Liang, *et al.*, "Potential biochemical therapy of glioma cancer," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 362, pp. 225-9, Oct 19 2007.
- [4] G. P. Dunn, I. F. Dunn, and W. T. Curry, "Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma," *Cancer Immun*, vol. 7, p. 12, 2007.
- [5] R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, *et al.*, "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma," *N Engl J Med*, vol. 352, pp. 987-96, Mar 10 2005.
- [6] R. Stupp, M. E. Hegi, M. J. van den Bent, W. P. Mason, M. Weller, R. O. Mirimanoff, *et al.*, "Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma," *Oncologist*, vol. 11, pp. 165-80, Feb 2006.

- [7] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvret, *et al.*, "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system," *Acta Neuropathol*, vol. 114, pp. 97-109, Aug 2007.
- [8] C. Brennan, H. Momota, D. Hambardzumyan, T. Ozawa, A. Tandon, A. Pedraza, *et al.*, "Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations," *PLoS One*, vol. 4, p. e7752, 2009.
- [9] J. Skog, T. Wurdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, *et al.*, "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers," *Nat Cell Biol*, vol. 10, pp. 1470-6, Dec 2008.
- [10] N. A. Charles, E. C. Holland, R. Gilbertson, R. Glass, and H. Kettenmann, "The brain tumor microenvironment," *Glia*, vol. 59, pp. 1169-80, Aug 2011.
- [11] A. Privat, "[Treatment of the future for spinal cord injuries]," *Rev Prat*, vol. 45, pp. 2051-6, Oct 15 1995.
- [12] Y. Zhang and B. A. Barres, "Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology," *Curr Opin Neurobiol*, vol. 20, pp. 588-94, Oct 2010.
- [13] P. G. Haydon, "GLIA: listening and talking to the synapse," *Nat Rev Neurosci*, vol. 2, pp. 185-93, Mar 2001.
- [14] M. V. Sofroniew, "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation," *Trends Neurosci*, vol. 32, pp. 638-47, Dec 2009.
- [15] A. A. Babcock, W. A. Kuziel, S. Rivest, and T. Owens, "Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS," *J Neurosci*, vol. 23, pp. 7922-30, Aug 27 2003.
- [16] A. Buffo, I. Rite, P. Tripathi, A. Lepier, D. Colak, A. P. Horn, *et al.*, "Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, pp. 3581-6, Mar 4 2008.
- [17] B. H. Rath, A. Wahba, K. Camphausen, and P. J. Tofilon, "Coculture with astrocytes reduces the radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells and identifies additional targets for radiosensitization," *Cancer Med*, Oct 30 2015.
- [18] R. J. Rodrigues, A. R. Tome, and R. A. Cunha, "ATP as a multi-target danger signal in the brain," *Front Neurosci*, vol. 9, p. 148, 2015.
- [19] W. Kang and J. M. Hebert, "Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective," *Mol Neurobiol*, vol. 43, pp. 147-54, Jun 2011.
- [20] J. X. Wilson, "Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes," *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 75, pp. 1149-63, Oct-Nov 1997.
- [21] G. Burnstock, "Purinergic signalling and disorders of the central nervous system," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 7, pp. 575-90, Jul 2008.
- [22] F. B. Morrone, M. C. Jacques-Silva, A. P. Horn, A. Bernardi, G. Schwartzmann, R. Rodnight, *et al.*, "Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines," *J Neurooncol*, vol. 64, pp. 211-8, Sep 2003.
- [23] F. B. Morrone, D. L. Oliveira, P. Gamermann, J. Stella, S. Wofchuk, M. R. Wink, *et al.*, "In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model," *BMC Cancer*, vol. 6, p. 226, 2006.

- [24] E. Braganhol, F. B. Morrone, A. Bernardi, D. Huppes, L. Meurer, M. I. Edelweiss, *et al.*, "Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth," *Cancer Sci*, vol. 100, pp. 1434-42, Aug 2009.
- [25] E. Braganhol, F. Kukulski, S. A. Levesque, M. Fausther, E. G. Lavoie, A. Zanotto-Filho, *et al.*, "Nucleotide receptors control IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 secretions as well as proliferation in human glioma cells," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1852, pp. 120-30, Jan 2015.
- [26] A. Jahani-Asl and A. Bonni, "iNOS: a potential therapeutic target for malignant glioma," *Curr Mol Med*, vol. 13, pp. 1241-9, Sep 2013.
- [27] N. Toda, K. Ayajiki, and T. Okamura, "Cerebral blood flow regulation by nitric oxide in neurological disorders," *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 87, pp. 581-94, Aug 2009.
- [28] V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield, and A. M. Stella, "Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity," *Nat Rev Neurosci*, vol. 8, pp. 766-75, Oct 2007.
- [29] V. Kostourou, J. E. Cartwright, A. P. Johnstone, J. K. Boulton, E. R. Cullis, G. Whitley, *et al.*, "The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis," *Br J Cancer*, vol. 104, pp. 83-90, Jan 4 2011.
- [30] J. Zhang, S. Sarkar, R. Cua, Y. Zhou, W. Hader, and V. W. Yong, "A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis," *Carcinogenesis*, vol. 33, pp. 312-9, Feb 2012.
- [31] X. Jin, S. H. Kim, H. M. Jeon, S. Beck, Y. W. Sohn, J. Yin, *et al.*, "Interferon regulatory factor 7 regulates glioma stem cells via interleukin-6 and Notch signalling," *Brain*, vol. 135, pp. 1055-69, Apr 2012.
- [32] C. E. Rolle, S. Sengupta, and M. S. Lesniak, "Mechanisms of immune evasion by gliomas," *Adv Exp Med Biol*, vol. 746, pp. 53-76, 2012.
- [33] M. L. da Frola, Jr., E. Braganhol, A. D. Canedo, F. Klamt, M. A. Apel, B. Mothes, *et al.*, "Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture," *Invest New Drugs*, vol. 27, pp. 13-20, Feb 2009.
- [34] J. B. Hoppe, M. Rattray, H. Tu, C. G. Salbego, and H. Cimarosti, "SUMO-1 conjugation blocks beta-amyloid-induced astrocyte reactivity," *Neurosci Lett*, vol. 546, pp. 51-6, Jun 24 2013.
- [35] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal Biochem*, vol. 72, pp. 248-54, May 7 1976.
- [36] H. Esterbauer and K. H. Cheeseman, "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal," *Methods Enzymol*, vol. 186, pp. 407-21, 1990.
- [37] H. Aebi, "Catalase in vitro," *Methods Enzymol*, vol. 105, pp. 121-6, 1984.
- [38] H. P. Misra and I. Fridovich, "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase," *J Biol Chem*, vol. 247, pp. 3170-5, May 25 1972.
- [39] K. M. Chan, D. Delfert, and K. D. Junger, "A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity," *Anal Biochem*, vol. 157, pp. 375-80, Sep 1986.

- [40] M. R. Wink, G. Lenz, E. Braganhol, A. S. Tamajusuku, G. Schwartzmann, J. J. Sarkis, *et al.*, "Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines," *Cancer Lett*, vol. 198, pp. 211-8, Aug 20 2003.
- [41] K. Abe and H. Saito, "Adenosine stimulates stellation of cultured rat cortical astrocytes," *Brain Res*, vol. 804, pp. 63-71, Aug 31 1998.
- [42] M. Tafani, M. Di Vito, A. Frati, L. Pellegrini, E. De Santis, G. Sette, *et al.*, "Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma," *J Neuroinflammation*, vol. 8, p. 32, 2011.
- [43] A. Hara and I. Okayasu, "Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance," *Acta Neuropathol*, vol. 108, pp. 43-8, Jul 2004.
- [44] M. Ishimaru, N. Yusuke, M. Tsukimoto, H. Harada, T. Takenouchi, H. Kitani, *et al.*, "Purinergic signaling via P2Y receptors up-mediate IL-6 production by liver macrophages/Kupffer cells," *J Toxicol Sci*, vol. 39, pp. 413-23, Jun 2014.
- [45] B. Zhao, B. Zhou, L. Bao, Y. Yang, and K. Guo, "Alpha-Tomatine Exhibits Anti-inflammatory Activity in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages," *Inflammation*, vol. 38, pp. 1769-76, Oct 2015.
- [46] Y. N. Huang, Y. J. Ho, C. C. Lai, C. T. Chiu, and J. Y. Wang, "1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures," *J Neuroinflammation*, vol. 12, p. 147, 2015.
- [47] S. V. Puram, C. M. Yeung, A. Jahani-Asl, C. Lin, N. de la Iglesia, G. Konopka, *et al.*, "STAT3-iNOS Signaling Mediates EGFRvIII-Induced Glial Proliferation and Transformation," *J Neurosci*, vol. 32, pp. 7806-18, Jun 6 2012.
- [48] M. Nitta, D. Kozono, R. Kennedy, J. Stommel, K. Ng, P. O. Zinn, *et al.*, "Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy," *PLoS One*, vol. 5, p. e10767, 2010.
- [49] A. M. Griesinger, R. J. Josephson, A. M. Donson, J. M. Mulcahy Levy, V. Amani, D. K. Birks, *et al.*, "Interleukin-6/STAT3 Pathway Signaling Drives an Inflammatory Phenotype in Group A Ependymoma," *Cancer Immunol Res*, vol. 3, pp. 1165-74, Oct 2015.
- [50] R. Chen, A. B. Alvero, D. A. Silasi, K. D. Steffensen, and G. Mor, "Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells," *Oncogene*, vol. 27, pp. 225-33, Jan 7 2008.
- [51] C. Y. Chang, M. C. Li, S. L. Liao, Y. L. Huang, C. C. Shen, and H. C. Pan, "Prognostic and clinical implication of IL-6 expression in glioblastoma multiforme," *J Clin Neurosci*, vol. 12, pp. 930-3, Nov 2005.
- [52] L. Brunelli, V. Yermilov, and J. S. Beckman, "Modulation of catalase peroxidatic and catalytic activity by nitric oxide," *Free Radic Biol Med*, vol. 30, pp. 709-14, Apr 1 2001.
- [53] T. Koken, M. Serteser, A. Kahraman, G. Akbulut, and O. N. Dilek, "Which is more effective in the prevention of renal ischemia-reperfusion-induced oxidative injury in the early period in mice: interleukin (IL)-10 or anti-IL-12?," *Clin Biochem*, vol. 37, pp. 50-5, Jan 2004.

- [54] A. Wu, J. Wei, L. Y. Kong, Y. Wang, W. Priebe, W. Qiao, *et al.*, "Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia," *Neuro Oncol*, vol. 12, pp. 1113-25, Nov 2010.
- [55] S. Carballal, S. Bartesaghi, and R. Radi, "Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxyxynitrite," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1840, pp. 768-80, Feb 2014.
- [56] Y. J. Cao, Y. M. Zhang, J. P. Qi, R. Liu, H. Zhang, and L. C. He, "Ferulic acid inhibits H₂O₂-induced oxidative stress and inflammation in rat vascular smooth muscle cells via inhibition of the NADPH oxidase and NF-kappaB pathway," *Int Immunopharmacol*, vol. 28, pp. 1018-25, Oct 2015.
- [57] D. Brisevac, M. Adzic, D. Laketa, A. Parabucki, M. Milosevic, I. Lavrnja, *et al.*, "Extracellular ATP Selectively Upregulates Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2 and Ecto-5'-Nucleotidase by Rat Cortical Astrocytes In Vitro," *J Mol Neurosci*, vol. 57, pp. 452-62, Nov 2015.
- [58] E. Panther, M. Idzko, Y. Herouy, H. Rheinen, P. J. Gebicke-Haerter, U. Mrowietz, *et al.*, "Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells," *Faseb j*, vol. 15, pp. 1963-70, Sep 2001.
- [59] E. Panther, S. Corinti, M. Idzko, Y. Herouy, M. Napp, A. la Sala, *et al.*, "Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells," *Blood*, vol. 101, pp. 3985-90, May 15 2003.
- [60] F. Vincenzi, M. Padovan, M. Targa, C. Corciulo, S. Giacuzzo, S. Merighi, *et al.*, "A(2A) adenosine receptors are differentially modulated by pharmacological treatments in rheumatoid arthritis patients and their stimulation ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats," *PLoS One*, vol. 8, p. e54195, 2013.
- [61] M. G. Christensen, S. K. Fagerberg, P. I. de Bruijn, R. G. Bjaelde, H. Jakobsen, J. Leipziger, *et al.*, "[Ca²⁺]_i Oscillations and IL-6 Release Induced by alpha-Hemolysin from Escherichia coli Require P2 Receptor Activation in Renal Epithelia," *J Biol Chem*, vol. 290, pp. 14776-84, Jun 5 2015.
- [62] C. D. Douillet, W. P. Robinson, 3rd, P. M. Milano, R. C. Boucher, and P. B. Rich, "Nucleotides induce IL-6 release from human airway epithelia via P2Y2 and p38 MAPK-dependent pathways," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 291, pp. L734-46, Oct 2006.
- [63] M. Bustamante, R. Fernandez-Verdejo, E. Jaimovich, and S. Buvinic, "Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca(2+) signals and an IL-6 autocrine loop," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 306, pp. E869-82, Apr 15 2014.
- [64] H. C. Ludwig, S. Rausch, K. Schallock, and E. Markakis, "Expression of CD 73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry," *Anticancer Res*, vol. 19, pp. 1747-52, May-Jun 1999.
- [65] L. Bavaresco, A. Bernardi, E. Braganhol, A. R. Cappellari, L. Rockenbach, P. F. Farias, *et al.*, "The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation," *Mol Cell Biochem*, vol. 319, pp. 61-8, Dec 2008.

- [66] A. R. Cappellari, G. J. Vasques, L. Bavaresco, E. Braganhol, and A. M. Battastini, "Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion," *Mol Cell Biochem*, vol. 359, pp. 315-22, Jan 2012.
- [67] S. Gessi, V. Sacchetto, E. Fogli, S. Merighi, K. Varani, P. G. Baraldi, *et al.*, "Modulation of metalloproteinase-9 in U87MG glioblastoma cells by A3 adenosine receptors," *Biochem Pharmacol*, vol. 79, pp. 1483-95, May 15 2010.
- [68] S. Taliani, C. La Motta, L. Mugnaini, F. Simorini, S. Salerno, A. M. Marini, *et al.*, "Novel N2-substituted pyrazolo[3,4-d]pyrimidine adenosine A3 receptor antagonists: inhibition of A3-mediated human glioblastoma cell proliferation," *J Med Chem*, vol. 53, pp. 3954-63, May 27 2010.
- [69] C. S. Cobbs, J. E. Brenman, K. D. Aldape, D. S. Bredt, and M. A. Israel, "Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors," *Cancer Res*, vol. 55, pp. 727-30, Feb 15 1995.
- [70] J. Wei, J. Barr, L. Y. Kong, Y. Wang, A. Wu, A. K. Sharma, *et al.*, "Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression," *Clin Cancer Res*, vol. 16, pp. 461-73, Jan 15 2010.

8. Legends to figures

Figure 1. Glioma C6 and astrocyte culture morphology, cell viability and GFAP expression analysis (upper panel: astrocytes; lower panel: C6 glioma and astrocyte cocultures). **(A, B)** Phase contrast and Fluorescence **(C, D)** microphotographs were taken using an Olympus inverted microscope (10x magnification). **(E, F)** Cultures stained with May-Grunwald-Giemsa (40x magnification), **(G, H)** cells stained with sulfarodamine (10x magnification). **(I)** Cell culture viability using MTT method and **(J)** WB analyses and quantification of GFAP on culture homogenates. For I and J, data were expressed as media \pm S.E.M (n=3).

Figure 2. Total supernatant IL-6 and IL-10 contents were measured by ELISA. **(A)** IL-6 and **(B)** IL-10 contents were expressed as pg/mL. Data expressed as media \pm S.E.M (n=3). Different letters means significant difference for a $P < 0.01$, one-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test.

Figure 3. Oxidative stress parameters evaluation. **(A)** Total nitrite content was measured on culture media, **(B)** SOD activity, **(C)** CAT activity and **(D)** total TBARS content were measured on cell homogenates. Data expressed as media \pm S.E.M (n=3). Different letters means significant difference for a $P < 0.01$, one-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test.

Figure 4. NTPDase and ecto-5'-NT activities. **(A)** ATP, **(B)** ADP and **(C)** AMP hydrolysis profiles expressed as percentage of astrocyte hydrolysis rates. Data expressed as media \pm S.E.M (n=3). Different letters means significant difference for a $P < 0.01$, one-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test.

Figure 5. Landscape analysis of inflammatory, oxidative stress and purinergic signaling gene/protein interaction networks in gliomas. **(A)** Glioma gene

interaction network was generated using STRING database. Gene symbol was collected from HUGO, and interactions were handled in Medusa software for network construction.

Figure 1:

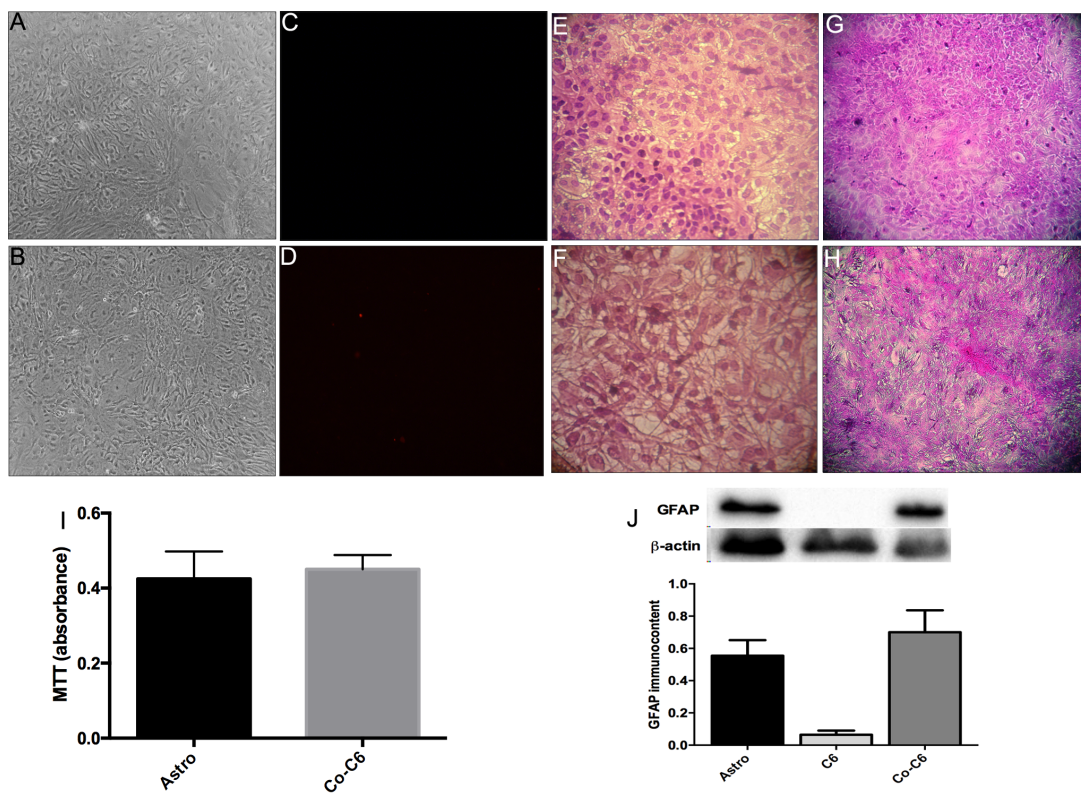


Figure 2:

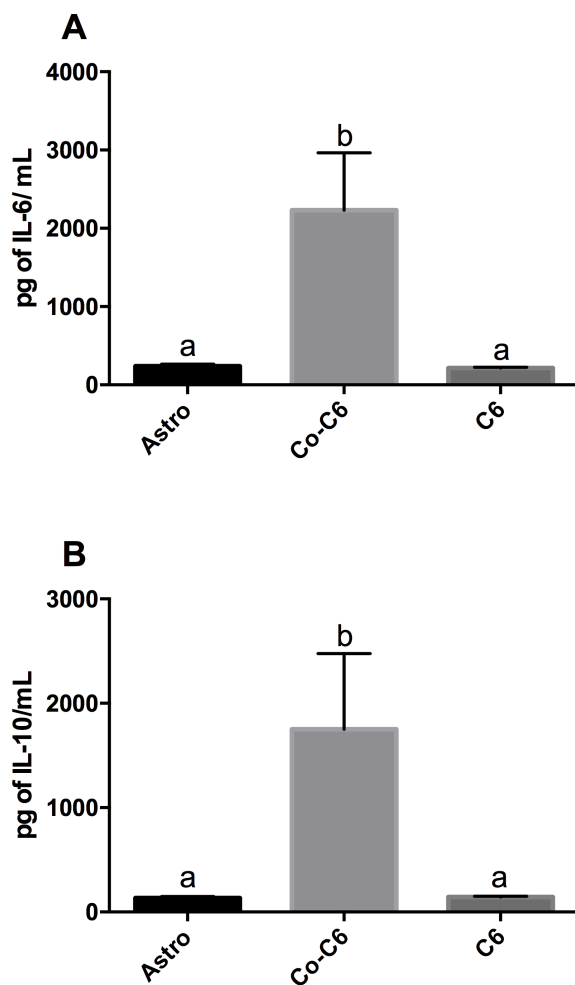


Figure 3:

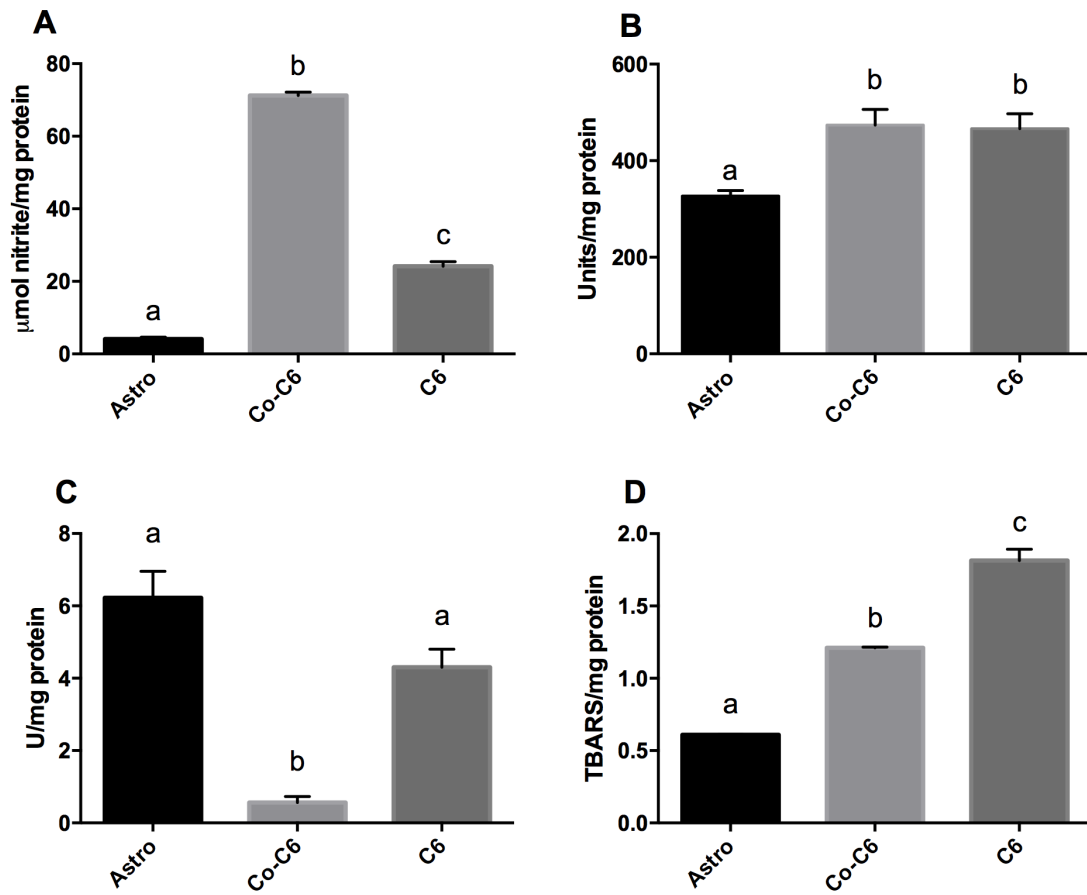


Figure 4:

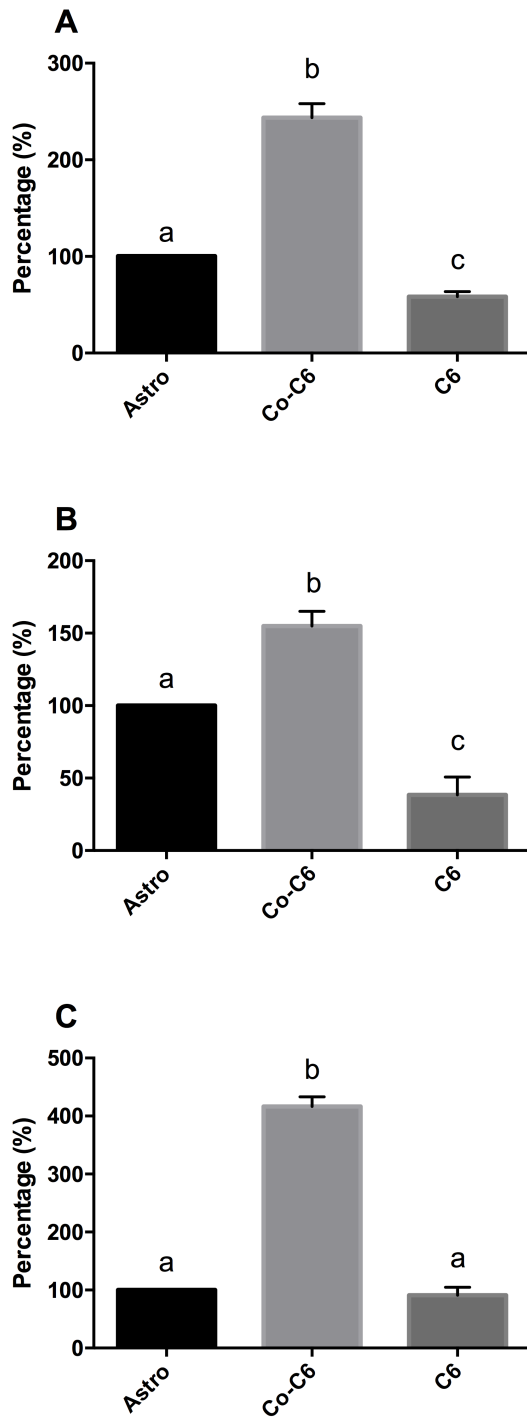
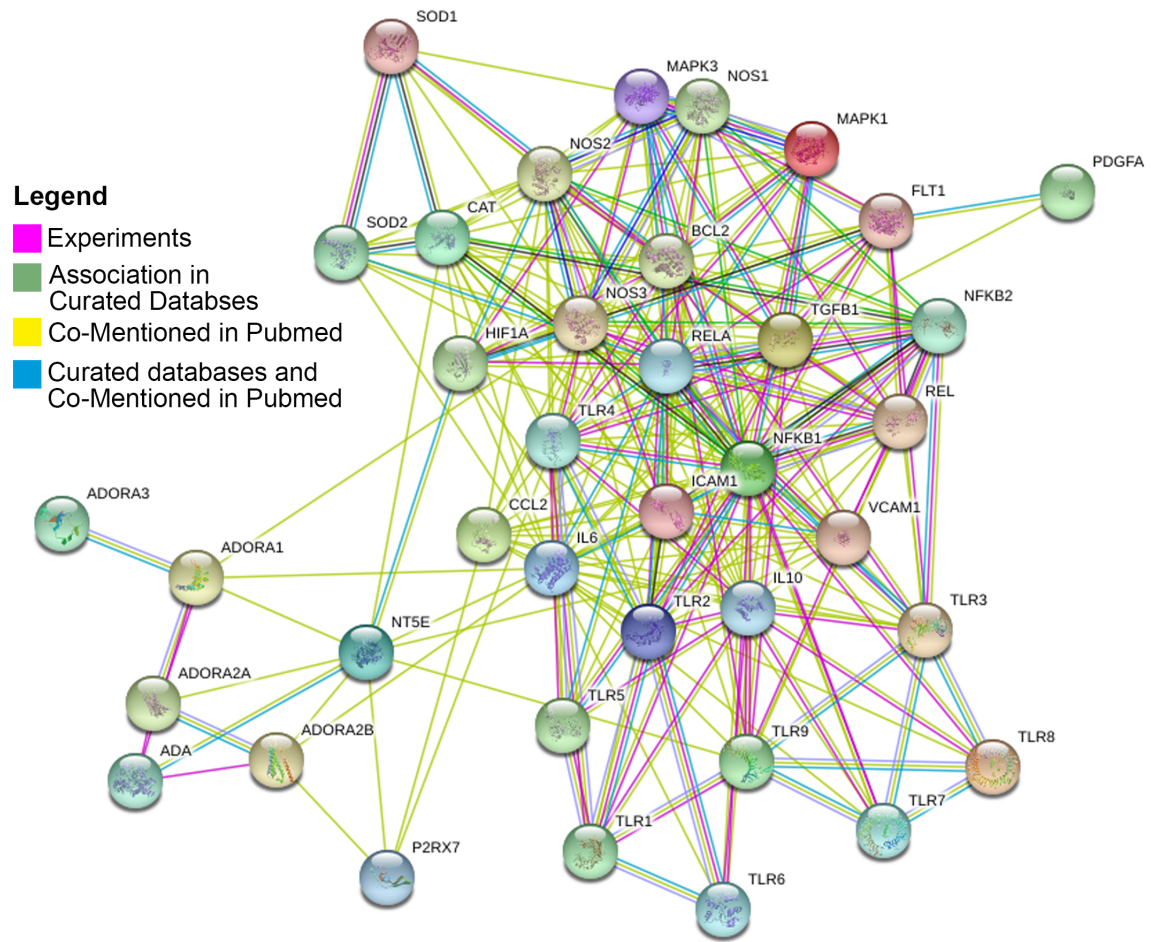


Figure 5:



Parte IV

5. Conclusão

Nosso trabalho foi capaz de mimetizar uma condição semelhante ao encontrado em estudos *in vivo* no que tange ao microambiente tumoral e marcadores de malignidade e proliferação.

- Nosso modelo induziu uma elevada liberação de Interleucinas para o meio de cultura, característica de tumores de alta malignidade e alta capacidade de evasão do sistema imune.
- Altas concentrações de nitrito extracelular foram encontradas no modelo de cocultivo, sugerindo uma elevada atividade da iNOS.
- As atividades de SOD e CAT foram significativamente alteradas de forma que altera toda a metabolização celular de espécies reativas de oxigênio podendo desencadear complicações para a estabilidade celular a longo prazo.
- Foi encontrado um perfil de peroxidação lipídica elevado para o cocultivo sugerindo um maior extravasamento de conteúdos intracelulares para o meio extracelular e maior sinalização inflamatória.
- O perfil de hidrólise de nucleotídeos foi alterado quando em cocultivo, sugerindo um aumento na expressão das NTPDases e da 5'-NT.

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.

6. Referências Bibliográficas

ABBRACCHIO, M. P.; CERUTI, S. Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. **Purinergic Signal**, v. 2, n. 4, p. 595-604, Nov 2006. ISSN 1573-9538 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-006-9016-0> >.

ABE, K.; SAITO, H. Adenosine stimulates stellation of cultured rat cortical astrocytes. **Brain Res**, v. 804, n. 1, p. 63-71, Aug 31 1998. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ANDRADE, S. P.; HART, I. R.; PIPER, P. J. Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature. **Br J Pharmacol**, v. 107, n. 4, p. 1092-5, Dec 1992. ISSN 0007-1188 (Print)0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ARAQUE, A. et al. Gliotransmitters travel in time and space. **Neuron**, v. 81, n. 4, p. 728-39, Feb 19 2014. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007> >.

ASTHAGIRI, A. R. et al. Advances in brain tumor surgery. **Neurol Clin**, v. 25, n. 4, p. 975-1003, viii-ix, Nov 2007. ISSN 0733-8619 (Print)0733-8619. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2007.07.006> >.

BABCOCK, A. A. et al. Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. **J Neurosci**, v. 23, n. 21, p. 7922-30, Aug 27 2003. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BAKSHI, A. et al. The expression of nitric oxide synthases in human brain tumours and peritumoral areas. **J Neurol Sci**, v. 155, n. 2, p. 196-203, Mar 5 1998. ISSN 0022-510X (Print)0022-510x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BAVARESCO, L. et al. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. **Mol Cell Biochem**, v. 319, n. 1-2, p. 61-8, Dec 2008. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-008-9877-3> >.

BEHIN, A. et al. Primary brain tumours in adults. **Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 323-31, Jan 25 2003. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)12328-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(03)12328-8) >.

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v. 43, n. 18, p. 5511-9, May 11 2004. ISSN 0006-2960 (Print)0006-2960. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/bi0362222> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)0003-2697. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRAGANHOL, E. et al. Nucleotide receptors control IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 secretions as well as proliferation in human glioma cells. **Biochim**

Biophys Acta, v. 1852, n. 1, p. 120-30, Jan 2015. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.014> >.

_____. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. **Cancer Sci**, v. 100, n. 8, p. 1434-42, Aug 2009. ISSN 1347-9032. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01219.x> >.

BRANDES, A. A.; PASETTO, L. M.; MONFARDINI, S. New drugs in recurrent high grade gliomas. **Anticancer Res**, v. 20, n. 3b, p. 1913-20, May-Jun 2000. ISSN 0250-7005 (Print)0250-7005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRETT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768-70, Oct 25 1990. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/347768a0> >.

BRETT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 2, p. 682-5, Jan 1990. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRENNAN, C. et al. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7752, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007752> >.

BRISEVAC, D. et al. Extracellular ATP Selectively Upregulates Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 2 and Ecto-5'-Nucleotidase by Rat Cortical Astrocytes In Vitro. **J Mol Neurosci**, v. 57, n. 3, p. 452-62, Nov 2015. ISSN 0895-8696. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-015-0601-y> >.

BROMBERG, J. E.; VAN DEN BENT, M. J. Oligodendrogliomas: molecular biology and treatment. **Oncologist**, v. 14, n. 2, p. 155-63, Feb 2009. ISSN 1083-7159. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0248> >.

BRUNELLI, L.; YERMILOV, V.; BECKMAN, J. S. Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 7, p. 709-14, Apr 1 2001. ISSN 0891-5849 (Print)0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BUFFO, A. et al. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 9, p. 3581-6, Mar 4 2008. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709002105> >.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 7, p. 575-90, Jul 2008. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2605> >.

_____. Purinergic cotransmission. **Exp Physiol**, v. 94, n. 1, p. 20-4, Jan 2009a. ISSN 0958-0670. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2008.043620> >.

_____. Purinergic signalling: past, present and future. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 1, p. 3-8, Jan 2009b. ISSN 0100-879x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BUSTAMANTE, M. et al. Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca(2+) signals and an IL-6 autocrine loop. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 306, n. 8, p. E869-82, Apr 15 2014. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00450.2013> >.

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 10, p. 766-75, Oct 2007. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2214> >.

CAO, Y. J. et al. Ferulic acid inhibits H₂O₂-induced oxidative stress and inflammation in rat vascular smooth muscle cells via inhibition of the NADPH oxidase and NF-kappaB pathway. **Int Immunopharmacol**, v. 28, n. 2, p. 1018-25, Oct 2015. ISSN 1567-5769. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.07.037> >.

CAPPELLARI, A. R. et al. Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion. **Mol Cell Biochem**, v. 359, n. 1-2, p. 315-22, Jan 2012. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-011-1025-9> >.

CAPPER, D. et al. Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation. **Acta Neuropathol**, v. 117, n. 4, p. 445-56, Apr 2009. ISSN 0001-6322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-009-0494-3> >.

CARBALLAL, S.; BARTESAGHI, S.; RADI, R. Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 2, p. 768-80, Feb 2014. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.005> >.

CHADWICK, B. P.; FRISCHAUF, A. M. 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. 357-67, Jun 15 1998. ISSN 0888-7543 (Print)0888-7543. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1998.5317> >.

CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. **Anal Biochem**, v. 157, n. 2, p. 375-80, Sep 1986. ISSN 0003-2697 (Print)0003-2697. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHANG, C. Y. et al. Prognostic and clinical implication of IL-6 expression in glioblastoma multiforme. **J Clin Neurosci**, v. 12, n. 8, p. 930-3, Nov 2005. ISSN 0967-5868 (Print)0967-5868. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2004.11.017> >.

CHARLES, N. A. et al. The brain tumor microenvironment. **Glia**, v. 59, n. 8, p. 1169-80, Aug 2011. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/glia.21136> >.

CHEN, R. et al. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. **Oncogene**, v. 27, n. 2, p. 225-33, Jan 7 2008. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210907> >.

CHINTALA, S. K.; TONN, J. C.; RAO, J. S. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. **Int J Dev Neurosci**, v. 17, n. 5-6, p. 495-502, Aug-Oct 1999. ISSN 0736-5748 (Print)0736-5748. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHRISTENSEN, M. G. et al. [Ca²⁺]_i Oscillations and IL-6 Release Induced by alpha-Hemolysin from Escherichia coli Require P2 Receptor Activation in Renal Epithelia. **J Biol Chem**, v. 290, n. 23, p. 14776-84, Jun 5 2015. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.639526> >.

COBBS, C. S. et al. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. **Cancer Res**, v. 55, n. 4, p. 727-30, Feb 15 1995. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CULLIS, E. R. et al. Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126. **Microvasc Res**, v. 71, n. 2, p. 76-84, Mar 2006. ISSN 0026-2862 (Print)0026-2862. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2006.01.004> >.

DA FROTA, M. L., JR. et al. Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture. **Invest New Drugs**, v. 27, n. 1, p. 13-20, Feb 2009. ISSN 0167-6997 (Print)0167-6997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-008-9134-3> >.

DAI, C.; HOLLAND, E. C. Glioma models. **Biochim Biophys Acta**, v. 1551, n. 1, p. M19-27, Aug 31 2001. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DOUILLET, C. D. et al. Nucleotides induce IL-6 release from human airway epithelia via P2Y2 and p38 MAPK-dependent pathways. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 291, n. 4, p. L734-46, Oct 2006. ISSN 1040-0605 (Print)1040-0605. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00389.2005> >.

DUNN, G. P.; DUNN, I. F.; CURRY, W. T. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. **Cancer Immun**, v. 7, p. 12, 2007. ISSN 1424-9634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-21, 1990. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FARIAS-EISNER, R. et al. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 20, p. 9407-11, Sep 27 1994. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FORSTERMANN, U. et al. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 5, p. 1788-92, Mar 1 1991. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. **Biochem Pharmacol**, v. 42, n. 10, p. 1849-57, Oct 24 1991. ISSN 0006-2952 (Print)0006-2952. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GESSI, S. et al. Modulation of metalloproteinase-9 in U87MG glioblastoma cells by A3 adenosine receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 10, p. 1483-95, May 15 2010. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.01.009> >.

GRIESINGER, A. M. et al. Interleukin-6/STAT3 Pathway Signaling Drives an Inflammatory Phenotype in Group A Ependymoma. **Cancer Immunol Res**, v. 3, n. 10, p. 1165-74, Oct 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.cir-15-0061> >.

HARA, A.; OKAYASU, I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. **Acta Neuropathol**, v. 108, n. 1, p. 43-8, Jul 2004. ISSN 0001-6322 (Print)0001-6322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-004-0860-0> >.

HAYDON, P. G. GLIA: listening and talking to the synapse. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 3, p. 185-93, Mar 2001. ISSN 1471-003X (Print)1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35058528> >.

HEINE, P. et al. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. **Eur J Biochem**, v. 262, n. 1, p. 102-7, May 1999. ISSN 0014-2956 (Print)0014-2956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HOPPE, J. B. et al. SUMO-1 conjugation blocks beta-amyloid-induced astrocyte reactivity. **Neurosci Lett**, v. 546, p. 51-6, Jun 24 2013. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.04.050> >.

HSU, C. Y. et al. Enhancement of apoptosis in cerebral endothelial cells by selected inflammatory signals. **Ann N Y Acad Sci**, v. 823, p. 148-53, Aug 14 1997. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HUANG, Y. N. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. **J Neuroinflammation**, v. 12, p. 147, 2015. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-015-0370-0> >.

ISHIMARU, M. et al. Purinergic signaling via P2Y receptors up-mediates IL-6 production by liver macrophages/Kupffer cells. **J Toxicol Sci**, v. 39, n. 3, p. 413-23, Jun 2014. ISSN 0388-1350. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JAHANI-ASL, A.; BONNI, A. iNOS: a potential therapeutic target for malignant glioma. **Curr Mol Med**, v. 13, n. 8, p. 1241-9, Sep 2013. ISSN 1566-5240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JIN, X. et al. Interferon regulatory factor 7 regulates glioma stem cells via interleukin-6 and Notch signalling. **Brain**, v. 135, n. Pt 4, p. 1055-69, Apr 2012. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/brain/aws028> >.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 51, p. 33116-22, Dec 20 1996. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KALOSHI, G. et al. Gray matter involvement predicts chemosensitivity and prognosis in gliomatosis cerebri. **Neurology**, v. 73, n. 6, p. 445-9, Aug 11 2009. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b163e2> >.

KANG, W.; HEBERT, J. M. Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. **Mol Neurobiol**, v. 43, n. 3, p. 147-54, Jun 2011. ISSN 0893-7648. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-011-8163-7> >.

KANU, O. O. et al. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. **Clin Med Oncol**, v. 3, p. 39-52, Apr 8 2009. ISSN 1177-9314 (Print)1177-9314. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KEGEL, B. et al. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 9, p. 1189-200, Sep 1997. ISSN 0028-3908 (Print)0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KIM, K. H. et al. Diverse influences of androgen-disrupting chemicals on immune responses mounted by macrophages. **Inflammation**, v. 37, n. 3, p. 649-56, Jun 2014. ISSN 0360-3997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-013-9781-1> >.

KIMELBERG, H. K.; KATZ, D. M. High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. **Science**, v. 228, n. 4701, p. 889-91, May 17 1985. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KOKEN, T. et al. Which is more effective in the prevention of renal ischemia-reperfusion-induced oxidative injury in the early period in mice: interleukin (IL)-10 or anti-IL-12? **Clin Biochem**, v. 37, n. 1, p. 50-5, Jan 2004. ISSN 0009-9120 (Print)0009-9120. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KOSTOUROU, V. et al. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. **Br J Cancer**, v. 104, n. 1, p. 83-90, Jan 4 2011. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6606034> >.

KUROSE, I. et al. 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. 1185-92, Nov 1996. ISSN 0270-9139 (Print)0270-9139. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510240534> >.

LAWS, E. R., JR.; SHAFFREY, M. E. The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. **Int J Dev Neurosci**, v. 17, n. 5-6, p. 413-20, Aug-Oct 1999. ISSN 0736-5748 (Print)0736-5748. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med**, v. 330, n. 9, p. 613-22, Mar 3 1994. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199403033300907> >.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 114, n. 2, p. 97-109, Aug 2007. ISSN 0001-6322 (Print)0001-6322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4> >.

LUDWIG, H. C. et al. Expression of CD 73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. **Anticancer Res**, v. 19, n. 3a, p. 1747-52, May-Jun 1999. ISSN 0250-7005 (Print)0250-7005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MAHER, C. O.; RAFFEL, C. Neurosurgical treatment of brain tumors in children. **Pediatr Clin North Am**, v. 51, n. 2, p. 327-57, Apr 2004. ISSN 0031-3955 (Print)0031-3955. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-3955\(03\)00206-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-3955(03)00206-2) >.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 25 1972. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MORRONE, F. B. et al. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. **J Neurooncol**, v. 64, n. 3, p. 211-8, Sep 2003. ISSN 0167-594X (Print)0167-594x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. **BMC Cancer**, v. 6, p. 226, 2006. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-6-226> >.

NITTA, M. et al. Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10767, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010767> >.

PANTHER, E. et al. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 3985-90, May 15 2003. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-07-2113> >.

_____. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. **Faseb j**, v. 15, n. 11, p. 1963-70, Sep 2001. ISSN 0892-6638 (Print)0892-6638. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0169com> >.

PAULUS, W.; TONN, J. C. Interactions of glioma cells and extracellular matrix. **J Neurooncol**, v. 24, n. 1, p. 87-91, 1995. ISSN 0167-594X (Print)0167-594x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PICCIRILLO, S. G. et al. Brain cancer stem cells. **J Mol Med (Berl)**, v. 87, n. 11, p. 1087-95, Nov 2009. ISSN 0946-2716. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-009-0535-3> >.

PICCIRILLO, S. G.; VESCOVI, A. L. Brain tumour stem cells: possibilities of new therapeutic strategies. **Expert Opin Biol Ther**, v. 7, n. 8, p. 1129-35, Aug 2007. ISSN 1471-2598. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.7.8.1129> >.

PREUSSER, M.; HABERLER, C.; HAINFELLNER, J. A. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. **Wien Med Wochenschr**, v. 156, n. 11-12, p. 332-7, Jun 2006. ISSN 0043-5341 (Print)0043-5341. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10354-006-0304-7> >.

PRIVAT, A. [Treatment of the future for spinal cord injuries]. **Rev Prat**, v. 45, n. 16, p. 2051-6, Oct 15 1995. ISSN 0035-2640 (Print)0035-2640. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PURAM, S. V. et al. STAT3-iNOS Signaling Mediates EGFRvIII-Induced Glial Proliferation and Transformation. **J Neurosci**, v. 32, n. 23, p. 7806-18, Jun 6 2012. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3243-11.2012> >.

RATH, B. H. et al. Coculture with astrocytes reduces the radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells and identifies additional targets for radiosensitization. **Cancer Med**, Oct 30 2015. ISSN 2045-7634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cam4.510> >.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v. 2, n. 2, p. 409-30, Jun 2006. ISSN 1573-9538 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5> >.

RODRIGUES, R. J.; TOME, A. R.; CUNHA, R. A. ATP as a multi-target danger signal in the brain. **Front Neurosci**, v. 9, p. 148, 2015. ISSN 1662-4548 (Print)1662-453x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2015.00148> >.

ROLLE, C. E.; SENGUPTA, S.; LESNIAK, M. S. Mechanisms of immune evasion by gliomas. **Adv Exp Med Biol**, v. 746, p. 53-76, 2012. ISSN 0065-2598 (Print)0065-2598. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-3146-6_5 >.

SANAI, N.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; BERGER, M. S. Neural stem cells and the origin of gliomas. **N Engl J Med**, v. 353, n. 8, p. 811-22, Aug 25 2005. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra043666> >.

SATHORNSUMETEE, S. et al. Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 2, p. 271-8, Jan 10

2008. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2007.13.3652> >.

SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J. N. Designer therapies for glioblastoma multiforme. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1142, p. 108-32, Oct 2008. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1444.009> >.

SCHMIDT, H. H. et al. Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. **Cell Calcium**, v. 13, n. 6-7, p. 427-34, Jun-Jul 1992. ISSN 0143-4160 (Print)0143-4160. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SHAO, Y.; MCCARTHY, K. D. Plasticity of astrocytes. **Glia**, v. 11, n. 2, p. 147-55, Jun 1994. ISSN 0894-1491 (Print)0894-1491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/glia.440110209> >.

SINGH, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396-401, Nov 18 2004. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature03128> >.

SKOG, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 12, p. 1470-6, Dec 2008. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1800> >.

SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 12, p. 638-47, Dec 2009. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002> >.

STIEBER, V. W. Low-grade gliomas. **Curr Treat Options Oncol**, v. 2, n. 6, p. 495-506, Dec 2001. ISSN 1527-2729 (Print)1534-6277. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J Exp Med**, v. 169, n. 5, p. 1543-55, May 1 1989. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STUPP, R. et al. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 26, p. 4127-36, Sep 10 2007. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2007.11.8554> >.

_____. Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. **Oncologist**, v. 11, n. 2, p. 165-80, Feb 2006. ISSN 1083-7159 (Print)1083-7159. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.11-2-165> >.

_____. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p. 987-96, Mar 10 2005. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa043330> >.

TAFANI, M. et al. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. **J**

Neuroinflammation, v. 8, p. 32, 2011. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-8-32> >.

TAKANO, T. et al. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. **Nat Med**, v. 7, n. 9, p. 1010-5, Sep 2001. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm0901-1010> >.

TALIANI, S. et al. Novel N2-substituted pyrazolo[3,4-d]pyrimidine adenosine A3 receptor antagonists: inhibition of A3-mediated human glioblastoma cell proliferation. **J Med Chem**, v. 53, n. 10, p. 3954-63, May 27 2010. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jm901785w> >.

TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide in neurological disorders. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 87, n. 8, p. 581-94, Aug 2009. ISSN 0008-4212. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/y09-048> >.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, Nov 2014. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014> >.

TZENG, E. et al. Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis. **Surgery**, v. 122, n. 2, p. 255-63, Aug 1997. ISSN 0039-6060 (Print)0039-6060. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VAN DEN BENT, M. J. Anaplastic oligodendroglioma and oligoastrocytoma. **Neurol Clin**, v. 25, n. 4, p. 1089-109, ix-x, Nov 2007. ISSN 0733-8619 (Print)0733-8619. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2007.07.013> >.

VINCENZI, F. et al. A(2A) adenosine receptors are differentially modulated by pharmacological treatments in rheumatoid arthritis patients and their stimulation ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54195, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054195> >.

VOUGIOUKAS, V. I.; WEBER, J.; SCHEUFLER, K. M. Clinical and radiological results after parapedicular screw fixation of the thoracic spine. **J Neurosurg Spine**, v. 3, n. 4, p. 283-7, Oct 2005. ISSN 1547-5654 (Print)1547-5646. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3171/spi.2005.3.4.0283> >.

VREDENBURGH, J. J. et al. Experience with irinotecan for the treatment of malignant glioma. **Neuro Oncol**, v. 11, n. 1, p. 80-91, Feb 2009. ISSN 1522-8517 (Print)1522-8517. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1215/15228517-2008-075> >.

WEI, J. et al. Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 2, p. 461-73, Jan 15 2010. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-1983> >.

WILSON, J. X. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 75, n. 10-11, p. 1149-63, Oct-Nov 1997. ISSN 0008-4212 (Print)0008-4212. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WINK, M. R. et al. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. **Cancer Lett**, v. 198, n. 2, p. 211-8, Aug 20 2003. ISSN 0304-3835 (Print)0304-3835. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WU, A. et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. **Neuro Oncol**, v. 12, n. 11, p. 1113-25, Nov 2010. ISSN 1522-8517. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/noq082> >.

XIE, K. et al. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. **J Exp Med**, v. 181, n. 4, p. 1333-43, Apr 1 1995. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YANG, T. et al. 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 Res**, v. 62, n. 9, p. 2583-91, May 1 2002. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YIN, L. T. et al. Potential biochemical therapy of glioma cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 362, n. 2, p. 225-9, Oct 19 2007. ISSN 0006-291X (Print)0006-291x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.167> >.

ZHANG, J. et al. A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 2, p. 312-9, Feb 2012. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgr289> >.

ZHANG, Y.; BARRES, B. A. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. **Curr Opin Neurobiol**, v. 20, n. 5, p. 588-94, Oct 2010. ISSN 0959-4388. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2010.06.005> >.

ZHAO, B. et al. Alpha-Tomatine Exhibits Anti-inflammatory Activity in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. **Inflammation**, v. 38, n. 5, p. 1769-76, Oct 2015. ISSN 0360-3997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-015-0154-9> >.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **Biochem J**, v. 285 (Pt 2), p. 345-65, Jul 15 1992. ISSN 0264-6021 (Print)0264-6021. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZIMMERMANN, H. G.; NEUNEIER, R.; GROTHMANN, R. Multi-agent modeling of multiple FX-markets by neural networks. **IEEE Trans Neural Netw**, v. 12, n. 4, p. 735-43, 2001. ISSN 1045-9227 (Print)1045-9227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1109/72.935087> >.