



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

**Investigação do impacto da comunicação entre glioma e macrófagos na
progressão e quimioresistência tumoral**

Juliana Hofstätter Azambuja

Pelotas, 2016.

Juliana Hofstätter Azambuja

**Investigação do impacto da comunicação entre glioma e macrófagos na
progressão e quimioresistência 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. Dra. Elizandra Braganhol

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosélia M. Spanevello

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A111i Azambuja, Juliana Hofstätter

Investigação do impacto da comunicação entre gliomas e macrófagos na progressão e quimiorresistência tumoral / Juliana Hofstätter Azambuja ; Elizandra Braganhol, orientadora ; Rosélia M. Spanevello, coorientadora. — Pelotas, 2016.

77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Gliomas. 2. Microambiente. 3. Macrófagos. 4. Quimiorresistência. 5. Sistema purinérgico. I. Braganhol, Elizandra, orient. II. Spanevello, Rosélia M., coorient. III. Título.

CDD : 574.192

**Investigação do impacto da comunicação entre glioma e macrófagos na
progressão e quimioresistência tumoral**

Aluno: Juliana Hofstätter Azambuja

Orientadora: Profa. Dra. Elizandra Braganhol

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosélia M. Spanevello

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Elizandra Braganhol: Elizandra Braganhol

Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello: Francieli Moro Stefanello

Profa. Dra. Gabriele Cordenonzi Ghisleni: Gabriele Cordenonzi Ghisleni

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo apoio incondicional durante todos os momentos, pela paciência em compreender e auxiliar nos momentos de dificuldade e por terem sido exemplos de vida e perseverança. Vocês tornaram essa realização possível.

À minha querida orientadora, Dra Elizandra Braganhol por ter oferecido minha primeira oportunidade na pesquisa, pela confiança no meu trabalho, paciência em ensinar, empenho e dedicação na minha formação, pelo imenso conhecimento compartilhado possibilitando meu crescimento profissional e amadurecimento e além de tudo por nunca ter deixado faltar um abraço apertado e uma palavra de incentivo.

À minha orientadora, Dra Rosélia Spanevello por toda a paciência, orientação e incentivo. Acima de tudo gostaria de agradecer por ter representando um porto seguro onde a porta sempre estava aberta para auxiliar nas resoluções das dificuldades, comemorar as vitórias e dividir um café.

Agradeço também a todos os colegas do Neurocan pelo convívio profissional e apoio, especialmente aos colegas Mariana, Simone, Daniel, Mayara, Pathise, Carlus e Nathalia companheiros de bancada e discussões científicas.

À Elita pela ajuda durante a realização dos experimentos, por ter me recebido no laboratório e me guiado durante meus primeiros passos, agradeço pelos ensinamentos, pela amizade e apoio nos momentos que eu precisei. Tua presença e orientação foram indispensáveis para minha formação e contigo apreendi a lutar pelo meu sonho independente das dificuldades.

À amiga e iniciação científica Taíse por ser incansável, competente e extremamente dedicada, muito obrigada por todos os finais de semana, feriados e horas a menos de sono dedicados a execução dos nossos trabalhos, desejo que no decorrer da tua carreira você tenha a sorte de cruzar com profissionais tão extraordinários como eu tive quando cruzei contigo.

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade do crescimento e aprendizado.

A Capes pelo incentivo científico, através de apoio financeiro.

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

Resumo

AZAMBUJA, Juliana Hofstätter. **Investigação do impacto da comunicação entre glioma e macrófagos na progressão e quimioresistência tumoral.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Gliomas são tumores que acometem o sistema nervoso central e compartilham semelhanças com células gliais. O glioblastoma multiforme constitui a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral, são instáveis, com grande capacidade de infiltração, angiogênese e resistência à quimioterapia. Alterações no sistema imune e do sistema purinérgico têm sido descritas como vias envolvidas na progressão destes tumores, onde um infiltrado inflamatório é correlacionado positivamente com a malignidade e um pior prognóstico para pacientes com glioma. Neste contexto, a relação entre a inflamação, imunidade inata e câncer é aceita; no entanto, muitos dos mecanismos moleculares e celulares que medeiam esta relação continuam obscuros. Portanto, nosso objetivo foi avaliar a polarização de macrófagos, parâmetros de estresse oxidativo, a atividade de ectonucleotidases e a citotoxicidade do ATP em macrófagos expostos ao meio condicionado-glioma (CM) ou cocultivados de maneira direta (CC) com células de glioma sensíveis a temozolomida (TMZ) ou resistentes. O tratamento de macrófagos com CM ou o cocultivo com as células de glioma induziu a polarização a macrófagos tipo-M2, enquanto a comunicação com células resistentes ao TMZ parece ser mais eficaz em induzir um ambiente imunossupressor quando em comparação com células sensíveis ao TMZ. Além disto, macrófagos expostos ao CM ou cocultivados com células GL261TMZ apresentam um aumento significativo da atividade de antioxidante superóxido dismutase, catalase e glutational peroxidase. Finalmente, a comunicação entre macrófagos e glioma promoveu uma diminuição de atividade ATPásica, ADPásica AMPásica que foi seguido por um aumento da sensibilidade à morte induzida por ATP. Os resultados sugerem uma modulação diferencial dos macrófagos pelas células sensíveis ou resistentes ao TMZ glioma, que podem ser importantes para o desenvolvimento de novas estratégias para superar a quimioresistência.

Palavras-chave: gliomas, macrófagos, microambiente, quimioresistência, sistema purinérgico.

Abstract

AZAMBUJA, Juliana Hofstätter. **Investigação do impacto da comunicação entre glioma e macrófagos na progressão e quimioresistência tumoral.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Gliomas are tumors that affect the central nervous system and share morphological similarities and gene expression in glial cells. Glioblastoma multiforme is the most common and devastating form of brain tumor, they are unstable with extensive infiltration capacity, angiogenesis and chemotherapy resistance. Alterations in the immune system and the purinergic system have been described as pathways involved in the progression of these tumors where an inflammatory infiltrate is positively correlated with malignancy and poor prognosis for patients with glioma. In this context, the relationship between inflammation, innate immunity and cancer is accepted; however, many of the molecular and cellular mechanisms that mediate this relationship remain unclear. The objective of this study was evaluate the macrophage polarization, oxidative stress parameters, activity of ectonucleotidases and ATP cytotoxicity in macrophages exposed to glioma-conditioned medium (CM) or co-culture direct (CC) with glioma temozolomide sensitive or resistant cells. The treatment of macrophages with glioma CM and CC induced M2-like macrophage polarization and GL261 TMZ-resistant cells seems to be more effective in induce an immunosuppressive environment when compared to GL261 TMZ-sensitive cells. Macrophage exposition to CM or co-cultured with GL261TMZ cells promoted a significant increase of antioxidant activity of SOD, catalase and GPx. Finally, macrophage glioma crosstalk promoted a decrease of ATPase, ADPase and AMPase hydrolysis which was followed by increased sensibility to ATP induced death. The results suggest a differential modulation of macrophage by glioma sensitive or TMZ-resistant cells, which may be important to develop new strategies to overcome chemoresistance.

Key words: gliomas, macrophage, microenvironment, chemoresistance purinergic system.

Lista de Figuras

Figura 1	Mecanismo de toxicidade da temozolomida.....	20
Figura 2	Propriedades funcionais de macrófagos polarizados.....	23
Figura 3	Representação esquemática de células e mediadores que influenciam a função dos macrófagos associados ao tumor.....	27
Figura 4	Componentes da sinalização purinérgica.....	31

Lista de Tabelas

Tabela 1	Classificação de receptores purinérgicos.....	30
-----------------	---	----

Lista de Abreviaturas

μM - Micromolar
ADP - Adenosina difosfato
AIC - 5-aminoimidazol-4-carboxamida
AMP - Adenosina monofosfato
APCs - Células apresentadoras de antígenos
ATP - Adenosina trifosfato
CD39 - NTPDase1
CD73 - Ecto-5'-nucleotidase
CM - Meio condicionado de glioma
CC - Cocultivo
eNOS - óxido nítrico sintase epitelial
E-NPP - Pirofosfatase ectonucleotidases
ERO - Espécies reativas de oxigênio
GBM - Glioblastoma multiforme
IFN-γ - Interferon gama
IL - Interleucina
iNOS - óxido nítrico sintase induzida
LPS - Lipopolissacarídeo
M1 - Macrófagos ativados de forma clássica
M2 - Macrófagos ativados de forma alternativa
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos
MHC - Complexo de histocompatibilidade
MIP-1^a - Proteína inflamatória de macrófago -1^a
MGMT - O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase
MMP-9 - Metalopeptidase de matriz 9
MTIC - 5-(3-methyltriazin-1-il)-imidazol-4-carboxamida
NO - Óxido Nítrico
NOS - Óxido nítrico sintase
NTPDase - Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
OMS - Organização Mundial da Saúde
P1 - Receptor de Adenosina
P2X- Receptor purinérgico ionotrópico
P2Y- Receptor purinérgico metabotrópico

ROIs - Intermediários reativos do oxigênio

SNC - Sistema Nervoso Central

TGF- α - Fator de necrose tumoral- alfa

TGF-beta - Fator de necrose tumoral- beta

TMZ - Temozolomida

TNF - Fator de necrose tumoral

UDP - Uridina difosfato

UTP - Uridina trifosfato

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Objetivo Geral.....	15
Objetivos Específicos	15
3. Revisão da Literatura.....	16
Gliomas	16
Taxa de incidência dos gliomas	16
A classificação dos gliomas.....	16
Glioblastoma multiforme (GBM)	17
Tratamento dos gliomas.....	18
Temozolomida (TMZ)	18
Processo inflamatório e os macrófagos	20
Fenótipo de ativação dos macrófagos.....	22
Óxido nítrico sintase induzida.....	23
Arginase	24
Macrófagos associados ao tumor (TAMs)	25
Sistema purinérgico.....	27
Receptores purinérgicos.....	28
Ectonucleotidases	29
Sistema purinérgico e a resposta imune	32
4. Manuscrito	32
5 Conclusões.....	67
6. Bibliografia	68

1. Introdução

Gliomas são os tumores primários mais comuns que acometem o sistema nervoso central (SNC) e compartilham semelhanças morfológicas e genéticas relacionadas as células gliais, tais como astrócitos e oligodendrócitos (Holland, 2001). Além disto, a ativação ou supressão de vias de transdução de sinal celular e a resistência à quimioterapia estão associadas com as anormalidades genéticas e moleculares comuns aos gliomas, contribuindo com o crescimento rápido e altos índices de recorrência justificando a necessidade de avanço na caracterização de novos alvos biológicos visando terapias antitumorais que possam aumentar a qualidade e a sobrevida dos pacientes (Yamanaka et al., 2009).

Os tumores cerebrais representam um verdadeiro desafio a ciência, devido a sua complexidade, a estratégia padrão utilizada para o tratamento dos gliomas é multimodal e baseada na ressecção cirúrgica sempre que possível seguida por seis semanas de radioterapia com terapia sistêmica concomitante com temozolomida (TMZ) (Mrugala et al., 2013). Porém, pacientes com glioblastoma multiforme (GBM) apresentam uma sobrevida média de 12-14 meses após o diagnóstico (Stupp et al., 2005). O prognóstico continua extremamente desanimador e a terapia paliativa porque gliomas são altamente resistentes à maioria dos fármacos citotóxicos e à radioterapia (Lefranc et al., 2005).

O sistema imune tem um importante papel na prevenção e progressão de tumores, sendo capaz de identificar ameaças a homeostase, reagindo de forma a eliminar, neutralizar ou tolerar e favorecer ações danosas, dependendo apenas do estímulo empregado. Neste contexto, o papel dos macrófagos residentes do SNC na biologia e no desenvolvimento de quimioresistência dos gliomas ainda está pouco elucidado, evidências indicam que o microambiente tumoral inflamatório constituído de macrófagos é correlacionado com aumento da malignidade e um pior prognóstico para os pacientes (Morimura et al., 1990). Em relação às funções antitumorais do infiltrado inflamatório associado aos gliomas, estas células apresentam potencial citotóxico comprometido e são estimuladas a assumir um fenótipo de promoção tumoral (Komohara et al., 2008). Porém, os mecanismos que envolvem esta interação ainda não estão completamente esclarecidos.

Além de um ambiente inflamatório propício alterações no sistema purinérgico estão envolvidas na progressão e malignidade dos gliomas (Braganhol et al, 2009). O ATP atua como molécula sinalizadora de dano desencadeando uma resposta do sistema imune (Zimmermann, 1994). Estudos demonstram que *in vivo* o ATP se acumula na periferia do tumor controlando a resposta inflamatória e levando a progressão tumoral (Braganhol et al, 2010). Portanto, desvendar a relação dos gliomas com o ambiente inflamatório e a modulação sobre a atividade do sistema purinérgico em macrófagos faz-se necessário para elucidar mecanismos de comunicação entre estas células e ainda sistemas envolvidos na progressão e quimioresistência tumoral, para no futuro possibilitar o desenvolvimento de terapias eficientes para pacientes acometidos por glioma.

2. Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi analisar o perfil de culturas de macrófagos expostas ao meio condicionado ou cocultivados de maneira direta com glioma sensível ao TMZ (GL261) ou quimioresistentes (GL261TMZ).

Objetivos Específicos

- Produzir uma linhagem de glioma resistente ao TMZ quimioterápico padrão atualmente utilizado

- Avaliar a modulação do fenótipo de macrófagos através da atividade da atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNos), arginase e secreção de citocinas TNF- α e IL-10 após exposição ao meio condicionado ou cocultivados de maneira direta com uma linhagem de glioma sensível ou resistente ao TMZ.

- Analisar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase e conteúdo tiólico total em macrófagos expostos ao meio condicionado ou cocultivados de maneira direta com uma linhagem de glioma sensível ou resistente ao TMZ.

- Avaliar o efeito do cocultivo e tratamento com meio condicionado de glioma sensível ou resistente ao TMZ sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP).

- Investigar o efeito do ATP em relação a proliferação em cultura de glioma sensível e resistente ao TMZ, macrófagos expostos ou não ao meio condicionado e em cocultivo com gliomas.

3. Revisão da Literatura

Gliomas

Taxa de incidência dos gliomas

Câncer é atualmente é uma das principais causas de morte em todo o mundo, representando um dos mais importantes problemas de saúde pública. No Brasil, a estimativa para o ano de 2016, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (Inca, 2016).

Os cânceres do SNC são as mais devastadoras das neoplasias malignas já descritas e para o Brasil estimam-se 5.440 casos novos de câncer do SNC em homens e 4.830 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 5,50 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 a cada 100 mil mulheres, o câncer de SNC contribui significativamente para a morbidade global (Inca, 2016). Além disto, os tumores do SNC são a segunda maior causa de neoplasias malignas durante a infância e, esta incidência em adultos aumenta com a idade (Louis et al., 2007).

Classificação dos gliomas

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

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

ependimárias ou de seus precursores) que, ocorrem com uma menor frequência (Kleihues, 2000 Louis et al., 2007).

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

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

Glioblastoma multiforme (GBM)

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

Entre as principais características histológicas observáveis, destaca-se o polimorfismo celular, mitose, hiper celularidade, traduzida pela proliferação de células imaturas, citoplasma de limites imprecisos, atipias nucleares, trombose vascular e proliferação microvascular (Kleihues, 2000). O GBM apresenta alta taxa de crescimento, o que resulta em extensas áreas de

destruição do tecido nervoso, causando edema, necrose e lesões infiltrativas no tecido que circunda o tumor (Laws et al, 1999). Tais características ainda levam a um crescimento rápido e a altos índices de recorrência (Stupp et al., 2009).

Tratamento dos gliomas

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

Pacientes com GBM apresentam uma sobrevida média de 12-14 meses após o diagnóstico. Quando comparado com a radioterapia administrada isoladamente, somente a combinação de quimioterapia com TMZ aumenta a média da sobrevida para 14,6 meses versus 12,1 meses (Stupp et al., 2005). Apesar dos intensos esforços, o prognóstico continua extremamente ruim porque procedimentos cirúrgicos que alcancem uma completa remoção do tumor não são comuns devido às capacidades invasivas e migratórias deste tumor. Além disto, as células neoplásicas são naturalmente resistentes à maioria dos fármacos citotóxicos e à radioterapia. Neste contexto, a taxa de sobrevivência é inferior a 30% para um ano, 5% para três anos e somente 2,7% para cinco anos (Johnson et al., 2012 Lefranc et al., 2005).

Apesar do tratamento com TMZ representar uma evolução, a terapia é paliativa e a eficácia esbarra na quimioresistência desenvolvida pelo tumor, uma vez que 90% dos GBMs recorrentes são insensíveis ao tratamento repetido com TMZ (Oliva et al, 2010). Portanto, compreender os mecanismos que geram resistência é essencial para o desenvolvimento de quimioterapias mais eficazes.

Temozolomida (TMZ)

TMZ é uma molécula de baixo peso molecular (194,15), de característica lipofílica capaz de adicionar grupamentos alquila ao DNA; atua como um pró-

fármaco, estável em valores de pH ácido (<5), uma propriedade que permite a administração oral, mas sofre rápida hidrólise espontânea acima de pH 7. Assim, o TMZ é rapidamente absorvido de maneira intacta e posteriormente sofre ruptura espontânea sem necessitar de ativação via metabolização hepática para formar monometilo triazeno 5-(3-methyltriazen-1-il)-imidazol-4-carboxamida (MTIC) que é quem possui a atividade citotóxica, agindo como agente alquilante. MTIC reage com mais água para libertar o 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) que é excretado através dos rins (Zhang et al., 2012).

O mecanismo de ação consiste na adição de um grupamento metila ao DNA nas posições N⁷ de guanina (70%), adenina N³ (9%) e resíduos de guanina O⁶ (6%). A eficácia do TMZ como um agente de dano ao DNA resulta principalmente da formação de O⁶-metilguanina, a qual parece incorretamente com uma timina (e não como uma citosina). Esta mutação é repetidamente reparada pela via *DNA mismatch repair* (MMR), mas, eventualmente, este processo falha e induz dano ao DNA seguido de parada do ciclo e morte celular por apoptose, senescência ou autofagia. Assim, para exercer seu efeito farmacológico, o TMZ necessita de um mecanismo MMR funcional (Fu et al., 2012).

Diversas vias de reparo do DNA promovem o desenvolvimento de resistência ao TMZ (Yoshimoto et al., 2012), levando a um impacto negativo na sobrevivência dos pacientes já que atualmente não existe um tratamento padrão para pacientes com recidiva/GBM resistente, sendo este um problema clínico significativo (Oliva et al., 2010).

A resistência ao TMZ, por meio do reparo de DNA pela enzima O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) representa uma importante barreira no tratamento de pacientes com GBM sendo o principal mecanismo de resistência à droga (Koukourakis et al., 2009). A MGMT é uma pequena proteína responsável pela desmetilação do DNA, removendo os grupamentos metil da posição O⁶ da guanina e transferindo-os para o resíduo de cisteína no seu centro ativo, resultando na inativação da atividade enzimática dessa proteína. Desta maneira, a eficiência da reparação é limitada pelo número de moléculas de MGMT disponíveis (Hansen et al., 2007). Pacientes que apresentam tumores com baixos níveis de expressão da enzima MGMT são mais suscetíveis à ação do TMZ e respondem melhor ao tratamento, pois as lesões celulares não são reparadas.

Embora a adição do TMZ à terapia anti-GBM tenha acarretado melhorias no prognóstico, quase todos os pacientes sofrem de recorrência da doença porque geralmente a eficácia esbarra na quimiorresistência desenvolvida pelo GBM. Neste contexto, o entendimento de vias responsáveis pelo desenvolvimento de resistência ao TMZ é necessário para possibilitar o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

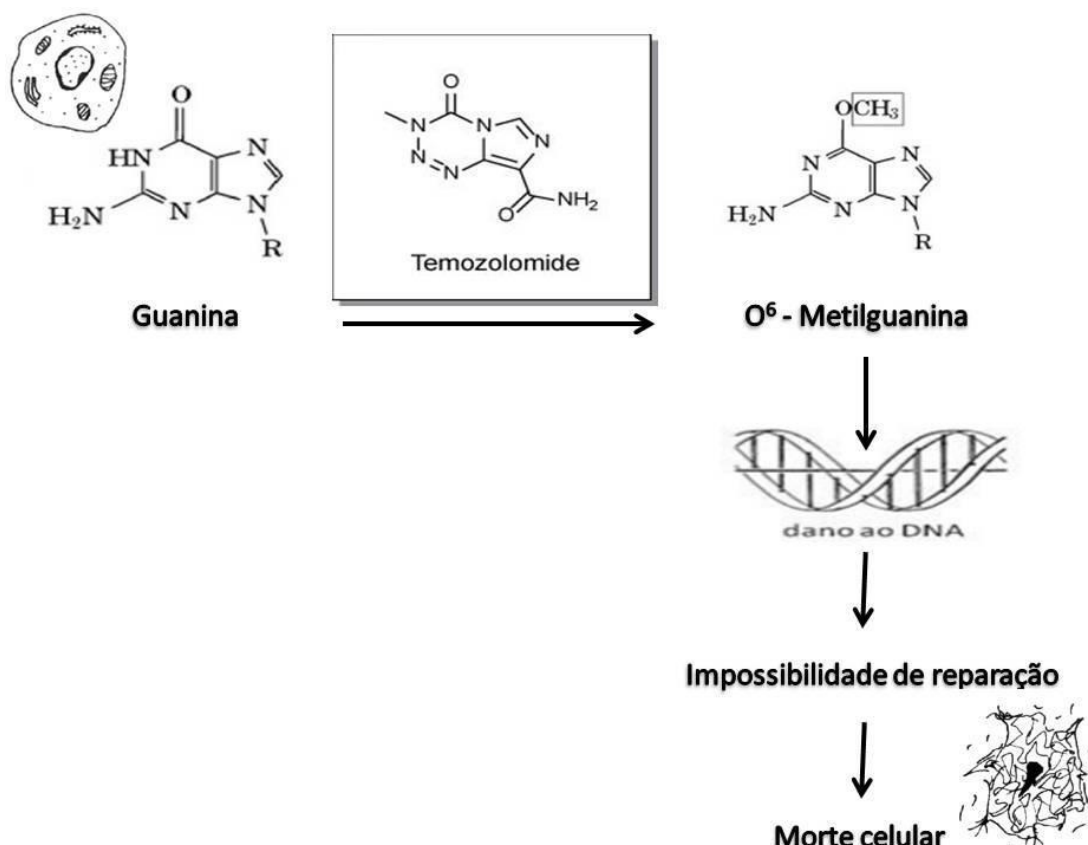


Figura 1: Mecanismo de toxicidade do Temozolomida. (Adaptado de Zaboikin et al., 2006).

Processo inflamatório e os macrófagos

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

pulmões, no fígado (células de Kupffer), na pele (células de Langerhans) e por todo baço, onde removem as células senescentes do sangue. Estas células podem ainda ser encontradas na cavidade peritoneal.

Os sinais responsáveis pela especialização dos macrófagos, específico em cada tecido, incluem produtos secretados, a superfície de células vizinhas e a composição da matriz extracelular (Gordon et al., 2001). Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e fazem parte, principalmente, da primeira linha de defesa contra patógenos, podendo ser identificados pela presença do marcador de superfície CD14 (Wright et al., 1998).

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

Quando em estado latente, monócitos e macrófagos caracterizam-se por baixa síntese proteica, produção de citocinas e taxa de consumo de oxigênio (Hume et al., 2002). Entretanto, uma vez iniciados processos de inflamação por danos teciduais ou infecções, tais células passam por um processo de ativação que promove aumento na produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios. Muitos são os mecanismos capazes de gerar uma mudança no perfil de ativação dos macrófagos. Entre eles, podemos citar sinais endógenos de perigo, como dano celular (Zhang et al., 2001), além de fatores de sinalização, como a produção diferencial de citocinas de linfócitos Th1 e Th2 da resposta imune inata e adaptativa, que são capazes de levar ao aumento da produção de fatores com atividade antimicrobial ou levar à susceptibilidade a infecções (Abbas, 2001).

Uma classificação muito usada para determinar os tipos de respostas que os macrófagos geram é a designação M1 (macrófagos ativados de forma clássica com função pró-inflamatória) e M2 (macrófagos ativados de forma alternativa com função anti-inflamatória), que marcam tipos fenotípicos distintos e opostos de macrófagos a um determinado tipo de resposta (Gordon et al., 2001).

Fenótipo de Ativação dos Macrófagos

Os macrófagos ativados de forma clássica (M1) são caracterizados por alta capacidade de apresentação de antígenos, produção de interleucinas 12 e 23 (IL-12; IL-23) e de intermediários tóxicos como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ERO). A polarização M1 de macrófagos pode ser induzida por agonistas de TLRs (*toll-like receptors*) como lipopolisacarídeo (LPS), INF- γ (Interferon gama) citocina produzida por linfócitos ativados na forma Th1 e também por células natural killer (NK), fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulador de colônia de granulócito/monócito. Esta ativação resulta em macrófagos efetores que atuam eliminando microrganismos e células tumorais, promovendo a resistência do organismo ao tumor através da liberação de NO, ERO e citocinas pró-inflamatórias (Mytar et al., 1999; Sunderkotter et al., 2004; Classen et al., 2009).

Os macrófagos ativados de forma alternativa (M2) são ativados por IL-4 e/ou IL-13 que são citocinas produzidas por linfócitos T, durante a resposta Th2 (Mytar et al., 1999). São caracterizados por alta atividade da enzima arginase, baixa produção de citocinas pró-inflamatórias e alta produção de mediadores anti-inflamatórios como a interleucina 10 (IL-10), o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) (Ginderachter et al., 2006) e a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a qual ativa angiogênese e tumorigênese (Mytar et al., 1999). Células que assumem este fenótipo promovem angiogênese, remodelação e reparo de tecidos, regulação da imunidade, resistência a parasitas e promoção tumoral (Mantovani, 2009; Mantovani et al., 2015).

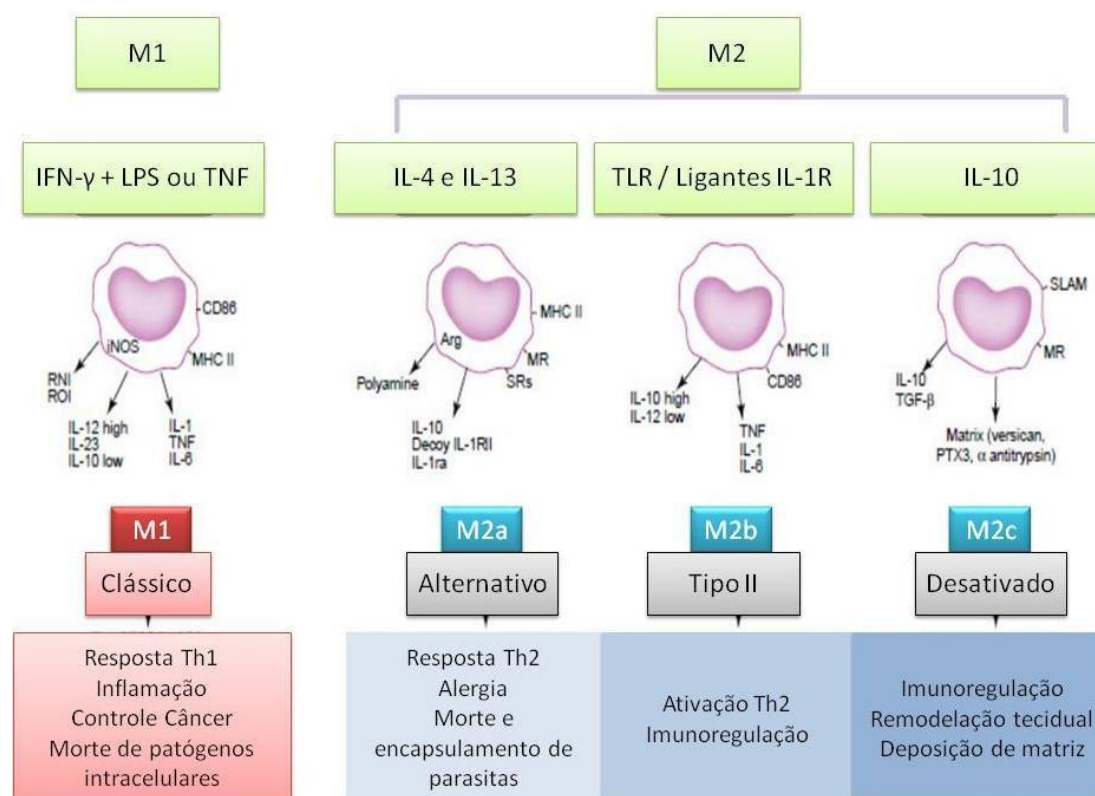


Figura 2: Indutores e propriedades funcionais de diferentes populações de macrófagos polarizados. Macrófagos expostos ao INF-gama e LPS polarizam a um fenótipo M1 enquanto macrófagos expostos a IL-4, IL-13 e IL-10 polarizam a M2 com funções imunomoduladoras e pró-tumorais. Legendas: IFN-γ (interferon gama), iNOS (óxido nítrico sintase induzida), LPS (Lipopolissacarídeo), MR (Receptor de manose), RNI (Intermediário reativo de nitrogênio), ROI (Intermediário reativo de oxigênio). Adaptado de Mantovani et al, TRENDS in Immunology Vol 25 nº12, December 2014.

Óxido nítrico sintase induzida

Duas vias bem estabelecidas do metabolismo da L-arginina em processos inflamatórios crônicos, como é o caso do câncer, elas são a conversão de L-arginina a NO e citrulina pela NOS (óxido nítrico sintase) ou pela ação da arginase onde a mesma é convertida em uréia e ornitina (Satriano, 2004).

O NO é um importante fator produzido por microglia e macrófagos ativados. É um potente mensageiro biológico de vida curta que apresenta

diversas funções biológicas, incluindo homeostasia vascular, neurotransmissão, ação microbicida, atividade antitumoral e citotoxicidade.

Em relação ao NO que é produzido a partir de L-arginina, enzimas distintas estão envolvidas na sua formação em diferentes tipos de células, sendo que todas elas utilizam NADPH como cofator. A NOS-I é primariamente encontrada em células neuronais centrais e periféricas, é constitutiva e Ca^{+2} -calmodulina-dependente (Satriano, 2004). A NOS-II ou iNOS é induzida em macrófagos e outras células pelas endotoxinas. Ela é Ca^{+2} -independente e requer, além de NADPH, a tetrahidrobiopterina. Esta isoforma induzível da NOS (iNOS) é encontrada também em hepatócitos, células do músculo liso vascular e endotelial em resposta a endotoxinas, citocinas e outros fatores pró-inflamatórios. Uma terceira isoenzima, a óxido nítrico sintase – III (NOS-III ou eNOS) tem sido descrita como similar a NOS-I. Anticorpos contra NOS-III mostraram que esta expressão é relativamente específica das células endoteliais (Satriano, 2004).

As elevadas concentrações de NO, resultantes da indução da iNOS durante a inflamação crônica podem ter um papel ativo no estabelecimento do câncer (Lind et al., 2004). E já foi demonstrado que a iNOS e eNOS são expressas em tecidos de câncer de mama invasivo (Loibl et al., 2002).

Arginase

A arginase é uma metaloenzima que catalisa o último passo do ciclo da ureia, envolvido na eliminação da amônia. Nos mamíferos existem duas isoformas da arginase: I e II que são codificadas por genes diferentes, estão localizadas em compartimentos distintos da célula e também têm distribuições teciduais desiguais (Ginderachter, 2006; da Silvia et al., 2008). A arginase I, presente no citosol, é muito expressa no fígado e sua principal função é a desintoxicação. A arginase II é uma enzima mitocondrial, expressa em níveis menores no rim, cérebro, intestino delgado e glândula mamária, com pouca ou nenhuma expressão no fígado (Grody, et al., 1987).

A arginase utiliza o substrato L-arginina para a produção de L-ornitina e uréia, dependente de Mn^{2+} favorecendo a proliferação celular e síntese de colágeno. Altos níveis desta enzima podem promover o crescimento tumoral sob diversos aspectos: aumentando produção de L-ornitina levando a aumento

da proliferação das células cancerígenas e supressão da atividade antitumoral da células T (Ginderachter, 2006).

Macrófagos associados ao tumor (TAMs)

As células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos e linfócitos estão presentes na maioria dos tumores sólidos. Estas células mediadoras das respostas inflamatórias são necessárias tanto para a progressão do tumor quanto para a eliminação deste (Maniati et al., 2010). Desta maneira, tumores são estruturas complexas formadas por diversos tipos celulares que podem contribuir de maneira diferente para a tumorigênese dependendo do estímulo empregado, esta combinação de células compõe o microambiente tumoral.

Tumores apresentam diversas características que permitem sua progressão e proliferação descontrolada, porém eles também necessitam de um microambiente adequado para sua manutenção e progressão. Nesse sentido, células tumorais atuam de maneira a promover o recrutamento das células do sistema imune com posterior condicionamento para que o microambiente tumoral promova um ambiente favorável a seu crescimento (Zou et al., 2010).

Os Macrófagos são a população de leucócitos mais abundantes nos tumores sólidos, porém seu papel na biologia de gliomas e os mecanismos que controlam a resposta destas células na resposta imune contra os tumores permanecem intrigantes e contraditórios. A respeito de seu potencial citotóxico, estas células podem infiltrar significativamente na massa tumoral e parecem favorecer o crescimento do tumor e não a sua erradicação (Badie et al., 2001) uma vez que já foi demonstrado que estão frequentemente relacionados com imunossupressão, angiogênese, invasividade, metástase e uma menor resposta à terapia farmacológica. A ativação controlada do sistema imune dentro do tumor pode fornecer uma arma adicional de defesa contra os tumores cerebrais (Ostuni et al., 2015; Mantovani et al., 2015; Zhai et al., 2011).

Macrófagos associados ao tumor tornam-se hiporesponsivos (Hussain et al., 2006) Após a migração dessas células mononucleares para os sítios neoplásicos, ocorrem mudanças nas suas propriedades tanto fenotípicas

quanto genótípicas (Shurin et al., 2009). Após o recrutamento das células do sistema imune para o sítio tumoral, elas são estimuladas a adquirir um fenótipo de ativação M2 levando a imunossupressão (Komohara et al., 2008) através de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 beta (IL-1 β) e o TNF- α (Zhang et al., 2011) e o aumento de citocinas imunossupressoras como o TGF- β 1 e interleucina 10 (IL-10) tanto por células de glioma como por macrófagos que contribuem no microambiente tumoral com a atividade e manutenção de células imunossupressoras T regulatórias (Tregs) (Kiefer et al., 1994). Além disso, os macrófagos podem secretar certas substâncias que são capazes de estimular o crescimento neoplásico, como fator de crescimento epidermal (EGF), VEGF e fatores pró-invasivos como metalopeptidase de matriz 9 (MMP-9) (Klimp et al., 2002; Shurin et al., 2009). Tais processos são importantes para sustentar o crescimento tumoral, invasão e neoangiogênese.

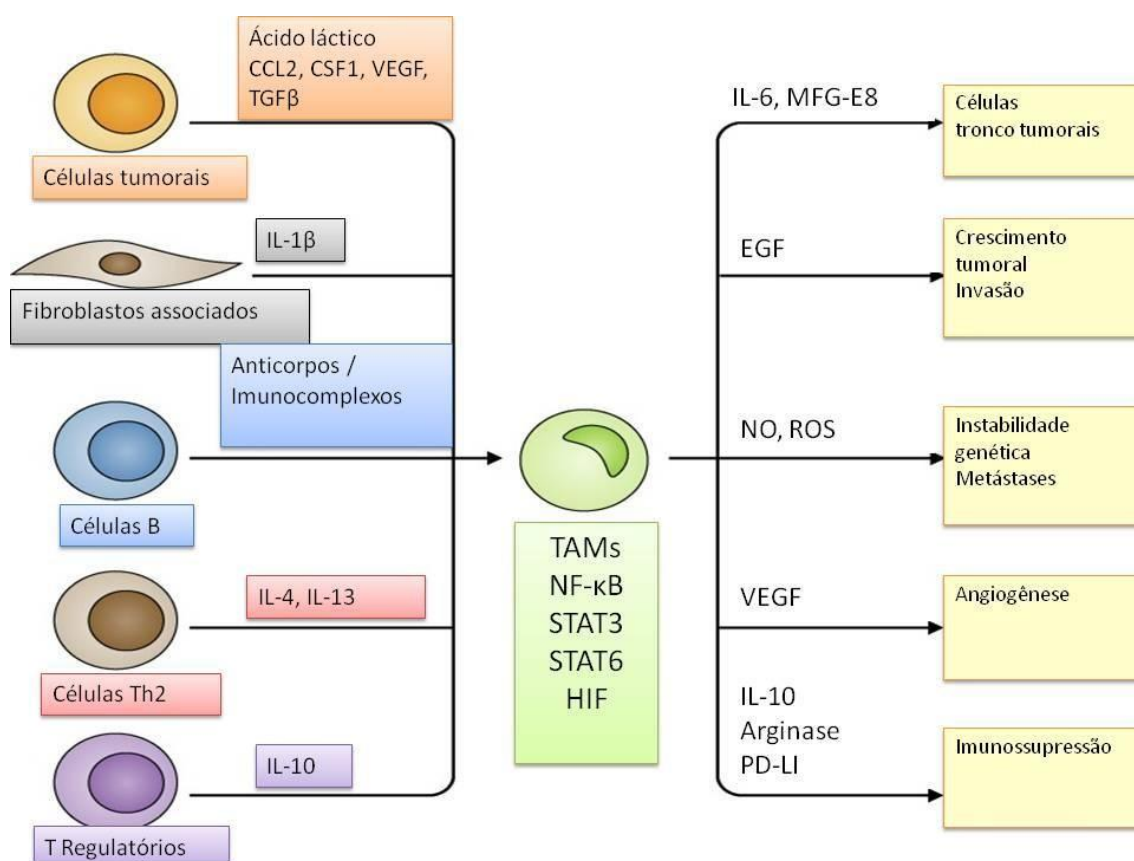


Figura 3: Representação esquemática de células e mediadores que influenciam a função dos TAMs. No lado esquerdo, as células pertencentes à rede imunológica, bem como células de tumor e fibroblastos associados a tumores, todos podem influenciar o condicionamento funcional de TAM através da produção de mediadores solúveis específicas que conduzem os TAMs a

polarização em promotores de tumor. No lado direito estão listadas as principais funções protumor de TAM. Por exemplo, através da produção de factores de sobrevivência (IL-6 e MFG-E8) TAM protegem o tumor do efeito tóxico da quimioterapia ou estimula diretamente a proliferação das células do tumor através do factor de crescimento epidérmico (EGF). Produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) induzem instabilidade genética. TAM favorecem neoangiogénese através da secreção de VEGF e suprimem respostas imunes porque expressam moléculas inibidoras (PD-L1) e produzir citocinas/mediadores imunossupressores (IL-10 e arginase). No retângulo verde, fatores de transcrição que orquestram a função TAM são realçados. Adaptado de Mantovani et al, The Journal of Experimental Medicine Vol 212 nº4, April 2015.

Sistema purinérgico

O adenosina 5'- trifosfato (ATP) é um nucleotídeo trifosfatado que, entre suas principais funções, está a de fornecer energia para as células dos organismos vivos (Jordan e Oster, 1948). Por décadas acreditou-se que esta fosse a única função do ATP (Burnstock, 2009). A história do sistema purinérgico inicia em 1929, quando Drury e Szent-Gyorgi descrevem as potentes ações das purinas no coração e em vasos sanguíneos de cães (Drury e Szent-Gyorgyi, 1929). Atualmente, sabemos que os nucleotídeos também atuam como moléculas sinalizadoras do sistema purinérgico e estão envolvidas na regulação de vários processos fisiopatológicos no meio extracelular.

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

São vários os mecanismos propostos para explicar a liberação dos nucleotídeos de adenina para o meio extracelular. O ATP pode atravessar a

membrana quando a mesma está danificada, pode passar a membrana celular através de transportadores ou canais, como conexinas e hemicanais ou ser liberado por exocitose de vesículas sinápticas a partir de neurônios ou de astrócitos ou em grânulos intracelulares (células não neuronais), ambos mediados por um mecanismo Ca^{2+} -dependente (Franke & Illes 2006).

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

Receptores purinérgicos

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

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

Os receptores P1 encontram-se amplamente distribuídos nas células, sendo expressos no coração, pulmão, fígado, testículos, músculo, medula espinhal, baço, intestino e cérebro (Burnstock, 2007). No sistema imune, estes

receptores estão presentes na maioria das células e medeiam os efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios da adenosina (Di virgilio, 2007).

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

Os receptores P2X são divididos em sete subtipos (P2X₁₋₇) que respondem ao ATP, enquanto que os receptores P2Y são subdivididos em oito subtipos (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11-14}) e podem ser ativados por ATP, ADP, UTP e UDP sendo sensíveis também a nucleotídeos de açúcares, como UDP-glicose e UDP-galactose (Di virgilio et al., 2002).

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

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

Tabela 1: Classificação de receptores purinérgicos (Adaptado de Ralevic e Burnstock, 1998).

	Receptores P1	Receptores P2	
Ligante	Adenosina	ATP, ADP, UTP, UDP	
Tipo	Acoplado a proteína G	Canal iônico	Acoplado a proteína G
Subgrupo	-	P2X	P2Y
Subtipo	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} e A ₃	P2X ₁₋₇	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , PY2 ₆ , PY2 ₁₁ , PY2 ₁₂ , PY2 ₁₄

Ectonucleotidases

Um fator importante que modula a resposta mediada por nucleotídeos é o metabolismo extracelular dos mesmos, catalisado pelas ectonucleotidases.

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

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

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

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

Quatro das NTPDases estão localizadas na superfície da célula com sítio catalítico voltado para o meio extracelular, sendo estas as NTPDases1,2,3 e 8, já as NTPDases5 e 6 apresentam localização intracelular, a primeira no retículo endoplasmático e a segunda o complexo de Golgi e tem preferências por nucleosídeos difosfatados. As NTPDases 4 e 7 são enzimas intracelulares com sítios ativos voltados para o lúmen de organelas citoplasmáticas, porém a NTPDases4 está localizada no complexo de golgi e prefere UTP como substrato enquanto que a NTPDases7 prefere nucleosídeos trifosfatados e está

localizada em vesículas extracelulares (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006; Lavoie et al., 2004).

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

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

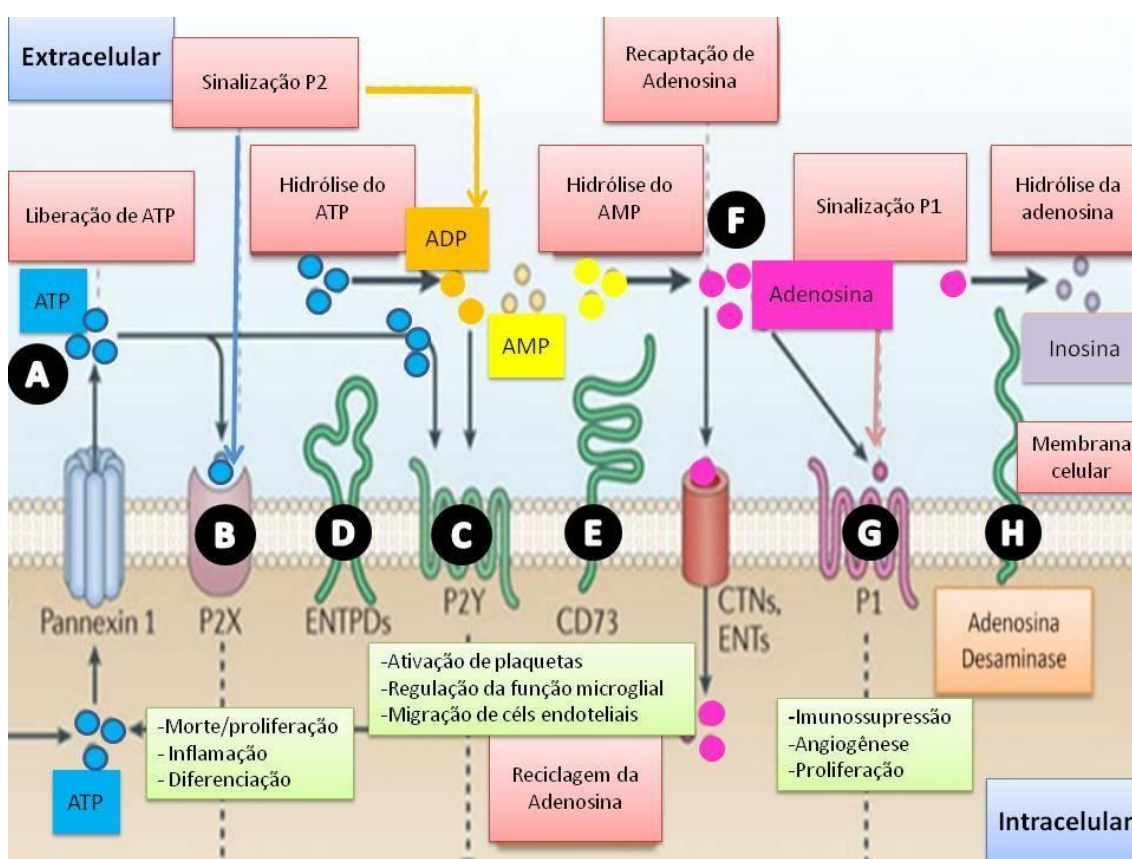


Figura 3: Componentes da sinalização purinérgica (A); ATP liberado extracelularmente (B); Receptor do tipo P2X (C); Receptor do tipo P2Y (D) E- NTPDase (ou CD39); (E) 5' nucleotidase (ou CD73); (F) Adenosina formada a partir do ATP via CD39 e CD73; (G) receptor do tipo P1; (H) ADA. Adaptada de Junger et al., 2011.

Sistema purinérgico e a resposta imune

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

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

Monócitos e macrófagos possuem em sua superfície receptores P2X e P2Y, cujas expressões variam de acordo com o estágio de maturação celular e

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

4. Manuscrito

O presente manuscrito está formatado segundo as normas da revista a qual foi submetido: Tumor Biology

GLIOMA SENSITIVE OR CHEMORESISTANT TO TEMOZOLOMIDE DIFFERENTIALLY MODULATE MACROPHAGE PROTUMOR ACTIVITIES

Juliana H. Azambuja¹, Elita F. da Silveira², Taíse R. de Carvalho¹, Pathise S. Oliveira¹, Simone Pacheco¹, Carlus Augustu Tavares do Couto¹, Fátima Terezinha Beira³, Francieli M. Stefanello¹, Roselia M. Spanevello¹, Elizandra Braganhol^{4*}.

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

² Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

*Corresponding Author

Elizandra Braganhol (E-mail: ebraganhol@ufcspa.edu.br)

Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA)

Rua Sarmento Leite, 245 – Prédio Principal – sala 304

CEP: 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: +55 51 3303 8762

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary malignant brain tumor and the current therapeutic strategies have shown limited efficacy because TMZ collides with the resistance developed by these tumors. Macrophages are a significant portion of the cells present in malignant glioma and they are also part of a microenvironment that promotes tumor progression through critical roles in angiogenesis, immunosuppression, and gliomagenesis. Purinergic signaling constitute a key element for formation, maintenance and increased malignancy of several solid tumors. The relation among inflammation, innate immunity and cancer is accepted; however, many of the molecular and cellular mechanisms mediating this relation remain unresolved. The objective of this study was evaluate the macrophage polarization, oxidative stress parameters, activity of ectonucleotidases and ATP cytotoxicity in macrophages exposed to glioma-conditioned medium (CM) or co-culture direct (CC) with glioma temozolomide sensitive or resistant cells. The treatment of macrophages with glioma CM and CC induced M2-like macrophage polarization and GL261 TMZ-resistant cells seems to be more effective in induce an immunosuppressive environment when compared to GL261 TMZ-sensitive cells. Macrophage exposition to CM or co-cultured with GL261TMZ cells promoted a significant increase of antioxidant activity of SOD, catalase and GPx. Finally, macrophage glioma crosstalk promoted a decrease of ATPase, ADPase and AMPase hydrolysis which was followed by increased sensibility to ATP induced death. The results suggest a differential modulation of macrophage by glioma sensitive or TMZ-resistant cells, which may be important to develop new strategies to overcome chemoresistance.

Key words: gliomas, macrophage, microenvironment, chemoresistance purinergic system.

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and devastating form of primary brain tumor, characterized by a high grade proliferation and invasion [1]. The current standard therapy for GBM includes surgery followed by radiotherapy and/or chemotherapy with the alkylating agent temozolomide (TMZ) [2-3]. However, these therapeutic strategies have shown limited efficacy and success of treatment as these tumors quickly develop chemoresistance to TMZ. Thus, currently the therapy is just palliative, which make necessary the characterization of novel biological targets or signaling pathways that may interfere in tumor progression, providing a better prognosis for patients [4].

The cancer and inflammation relationship has been the focus of many investigations. Tumor microenvironment plays a critical role in glioblastoma invasion and progression [5-8]. An inflammatory infiltrate consisting of macrophages is positively correlated with malignancy and poor prognosis for patients with glioma [9-11]. However, the role of immune cells in glioma progression remains controversial. The antitumor functions of inflammatory cells associated to gliomas are committed and macrophages present in the tumor environment would be encouraged to acquire an M2-like activation phenotype, leading to immunosuppression [12-13]. Furthermore, it has been proposed that, to promote tumor growth, macrophages increase secretion of growth factors, cytokines and angiogenic factors. Besides all those interactions that are already well established, there is still a great interest in elucidate the macrophage-glioma cell [14].

In this context, studies have suggested that tumor microenvironment induces inflammatory changes by modulating the purinergic signaling, which in turn promotes GBM growth [15-17]. Purinergic signaling has immunological consequences in cancer patients, ATP acts as a signaling molecule of damage triggering immune/inflammatory

responses [18]. Studies have shown that ATP accumulates in the periphery of tumors *in vivo* and controls the inflammatory response which may be important for the recruitment of macrophages to tumor sites, leading to tumor progression [19]. ATP conversion to adenosine by the action of ectonucleotidases creates an immunosuppressive microenvironment, which protect the tumors from immune attack [20].

Considering the role of inflammatory environment in GBM progression and the importance of purinergic signaling in modulating macrophage, it is necessary to elucidate the mechanisms involved in GBM-macrophage crosstalk and its impact on tumor progression and chemoresistance. A better understanding of immune-tumor cell interaction may enable the development of efficient immunotherapies against GBM. Therefore, the objective of this study was to evaluate whether the GBM sensitive or TMZ-resistant cells modulate the polarization, oxidative stress and purinergic system in macrophage cultures.

Materials and methods

Cell culture procedures. GL261 murine GBM cell line (isogenic to C57BL/6 mice) was grown and maintained in Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM; Gibco) containing 0.1% fungizone and 100 U/L penicillin/streptomycin and supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco). Cells were kept at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Establishment of TMZ resistance in GL261 glioma cell line. Stock solutions of temozolomide (TMZ; Sigma-Aldrich Co) were prepared in dimethylsulphoxide (DMSO) at concentration of 25 mM and diluted in the cell culture medium to obtain

2.5-2.560 μM final concentrations. GL261 TMZ-resistant cells were generated by exposing glioma cells to increasing TMZ concentrations diluted in DMEM/FBS-free medium. Following 24 h of TMZ treatment, the cells were allowed to recover for approximately 5-7 days and a new exposition was done. The TMZ resistance was acquire after 6 months of cell exposition and the resistant clones were isolated as previously described [21]. Acquired TMZ resistance was confirmed by MTT assay and cells not exposed to TMZ were included for parallel analysis, as described below. GL261 TMZ-resistant cells (GL261TMZ) were maintained in low TMZ concentration (160 μM).

Production of GL261 and GL261TMZ glioma conditioned medium (CM). To prepare the glioma conditioned medium (GL261-CM; GL261TMZ-CM), cells were seeded at a density of 3×10^5 cells in 75 cm^2 culture flasks. Once the subconfluence stage, the cell medium was replaced by fresh DMEM/10% FBS, and the cells were cultured for 24 h. The CM was collected, centrifuged ($1,000 g - 10 \text{ min}$) and stored at -80°C until use.

Primary macrophage culture and exposition to glioma-CM or co-culture with glioma cells. Peritoneal macrophages from mouse male C57BL/6 (6-8 weeks) were collected by lavage of the peritoneal cavity with DMEM/FBS-free medium as previously described [22]. Cells were centrifuged and suspended in DMEM/FBS-free medium, and the obtained cells were seeded in 6, 48 or 96 multi-well plates at densities of 1×10^6 , 3×10^5 and 1×10^5 cells/well, respectively. Macrophages were allowed to attach for 30 min and they were exposed to conditioned medium (CM-GL261 or CM-GL261TMZ) or directly co-cultured with GL261 or GL261TMZ. For co-culture purpose, 5×10^4 , 1×10^4 or 5×10^3 GL261 or GL261TMZ glioma cells/well were

seeded in 6, 48 or 96 multi-well plates under the macrophage monolayer. The analysis was performed 24 h following exposition. GL261, GL261TMZ glioma cultures or macrophages cultured alone under the same conditions were considered controls.

Cell viability assay. For the chemo-sensitivity assay, 5×10^3 cells/well were seeded in 96-well plates. After 24 h, the culture were replaced with fresh media in the absence or presence of increasing TMZ concentrations (0.1-200 μ M). Following 48 or 72 h of treatment, cell viability was assessed by 3(4,5-dimethyl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. This method is based on the ability of viable cells to reduce MTT and form a blue formazan product. MTT solution was added to the incubation medium in the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL. The cells were left for 90 min. The medium was then removed and plates were shaken with DMSO. The optical density of each well was measured at 492 nm. Results were expressed as absorbance.

Nitrite content and arginase activity determination. The amount of NO formed was estimated by measuring nitrite levels in the culture medium by Greiss reaction [24]. Briefly, 100 μ L of culture supernatant was mixed with 100 μ L sulfanilamide in 5% phosphoric acid, followed by a incubation of 10 min at room temperature. Then, 100 μ L n-1 l-naphthylethylenediamine (NED) 0.1% was added to the samples and incubated in the dark for 10 min to complete the reaction. The absorbance was determined in a spectrophotometer at 540 nm. The amount of nitrite in the supernatant was determined using a sodium nitrate standard curve. Results were expressed as μ mol of NO per mg of protein. Arginase activity in the cell lysates was measured based on the conversion of L-arginine to L-ornithine and urea [23]. Cell cultures were first lysed using 100 μ L of 0.1% Triton. Then, 50 μ L of Tris-HCl (50 mM; pH 7.5) and 10 μ L of MnCl_2 (10 mM) were added. Arginase was activated by heating (56°C-7 min). The enzyme reaction was

started by adding 200 μ L of 0.5 M arginine (pH 9.7; 37°C; 120 min) and it was stopped by adding 1.6 mL of a mixture containing H₂SO₄ (96%), H₃PO₄ (85%), and H₂O (1/3/7, v/v/v). Finally, 80 μ L of 6% α -isonitropropionophenone was added and the samples were incubated for 30 min at 95°C followed by an additional incubation of 30 min at 4°C. Urea concentration was determined in spectrophotometer at 540 nm. The values were determined using a urea standard curve. Results were expressed as mg of urea per min per mg of protein.

Cytokine release determination. TNF- α and IL-10 were determined in the supernatant of cell cultures by ELISA, following the manufacturer's recommendations (R & D Systems). Mouse recombinant TNF- α or IL-10 was used as a standard. Results were expressed as pg of cytokine per mL.

Oxidative stress analysis

Total thiol content assay. Total thiol content was determined using the DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) method as described by Aksenov and Markesbery with some modifications [29]. The reaction was based on the reduction of DTNB by thiols resulting in a yellow derivative (TNB) whose absorption is read in 412 nm. The results were expressed in nmol TNB / mg protein.

Glutathione peroxidase (GPx) assay. GPx activity was assayed in using the RANSOD kit of Randox. The results were expressed as units of activity of the GPx/mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) assay. SOD activity was measured by method according to Misra & Fridovich [28]. This method is based on the inhibition of superoxide

dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer adjusted at 480 nm. The specific activity of SOD was reported as units per mg of protein.

Catalase (CAT) assay. CAT activity was assayed according to Aebi [27] based on the decomposition of H₂O₂ monitored at 240 nm at ambient temperature. One CAT unit is defined as one μ mol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is reported as units/mg protein.

Ectonucleotidase activity determination. The ATPase, ADPase, and AMPase activities were determined in 48 multiwell plates. The enzymatic reaction was started with the addition of 200 μ L of incubation medium containing 2 mM CaCl₂ (for ATPase and ADPase assays) or 2 mM MgCl₂ (for AMPase assay), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES (pH 7.4), and 2 mM ATP, ADP or AMP as substrates. Incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was stopped with 150 μ L of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method described using malachite green as colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard [25]. Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [26] using serum albumin as standard. Activity was reported as μ mol Pi /min/mg of protein.

Treatment with ATP and determination of cell viability by Sulfarodamine B assay.

To determine cell proliferation, 120 minutes after the cultures are made (finished), it has been made a treatment with ATP (1 mM and 0,1mM), after 24 hours the cells were washed and added trichloroacetic acid 50% for 45 min in the fridge for cell fixation . After this period the acid was removed, and 5 washes were carried out with distilled water to full removal of the reagent, subsequently it was added to this solution B

sulfarodamina 0.4% acetic acid followed by a 30 minute incubation to stain proteins in solution, it was removed and washings were made 5 of the wells with 1% acetic acid for complete removal of uncomplexed dye with proteins. Finally, the plates were solubilized with Tris solution at 10 mM and then read in a spectrophotometer at a wavelength of 530 nm.

Statistical analysis. Data were expressed as mean $\pm$ SD and were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer post-hoc test (for multiple comparisons). Differences between mean values were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Characterization of GL261 TMZ resistance acquisition. The induction of GL261 chemoresistance was performed by exposing glioma cells to TMZ (2.5 μ M – 2.56 mM) through a period of 6 months as presented in Figure 1. . The acquisition of TMZ resistance was determined by exposing GL261 and GL261 submitted to chemoresistance protocol (GL261-TMZ) to increasing TMZ concentrations (0.1, 1, 10, 100 and 200 μ M). Following 48 h and 72 h. Control cultures were exposed to equivalent DMSO concentration (control vehicle). As expected, TMZ (100 and 200 μ M) and TMZ (1 to 200 μ M) reduced the GL261 cell viability in around 25% following 48 h and 72 h of treatment, respectively (Fig. 2A and 2B). In contrast, TMZ did not induce GL261-TMZ citotoxicity in any of time or chemotherapeutic tested concentrations (Fig. 2A and 2B). These results indicate that the protocol was efficient to induce a chemoresistance phenotype in GL261 glioma cells. Notably, GL261-TMZ was insensible to TMZ toxicity when compared to GL261 control cells (Fig. 2A and 2B).

Glioma-conditioned medium or co-culture with GL261 or GL261-TMZ differentially modulate macrophage polarization.

Macrophage classically/M1 activation is characterized biochemically by high capacity to present antigens, production of proinflammatory cytokines, as TNF- α , and high production of toxic intermediates such as nitric oxide (NO) and reactive oxygen species [31-32]. In opposite, macrophage alternative/M2 polarization is characterized by increased arginase activity, production of anti-inflammatory molecules, as IL-10 (interleukin 10) and VEGF (vascular endothelial growth factor) [33]. Cells that take this phenotype promote angiogenesis, remodeling and tissue repair, immunity regulation and tumor promotion [34]. Therefore, we evaluated whether glioma cell sensitive or TMZ-resistant may modulate macrophage polarization. In order to mimics the tumor microenvironment, macrophage cultures were exposed to conditioned medium of GL261 (GLCM) or GL261-TMZ (GLTMZCM) or, alternatively, macrophages were co-cultured directly with these cells (GLCC; GLTMZCC). Following 24 h of exposition, macrophage phenotype was determined as described in material and methods. Macrophages cultivated in DMEM/10% FBS were considered control (Fig. 3). We observed that the exposition of macrophages to GL261-CM promoted a significant increase of nitric oxide concentration (240%), TNF- α and IL-10 release (170% and 950%, respectively) while arginase activity was not changed when compared to control macrophages (Fig. 3).

In opposite, macrophages exposed to GL261TMZ-CM exhibited a decreased production of nitric oxide (88%), an increased arginase activity (71%) and IL-10 release (1,400%) when compared to control macrophages or macrophages exposed to GLCM. No difference in TNF- α release was observed when compared to control macrophages; however, it was decreased in 20% when compared to macrophages GLCM-treated cells (Fig. 3C).

Interestingly, macrophages subjected to co-culture conditions showed different responses when compared to cells treated with glioma CM. No difference in nitrite production, arginase activity and TNF- α release was observed in GLCC group (Fig. 3A, B and C). However, IL-10 release was increased in 1,180% when compared to control macrophages (Fig. 3D). In contrast, co-culture of macrophages with GL261TMZ (GLTMZCC group) exhibited a significant decrease of arginase activity and TNF- α release (44% and 66%, respectively) and increased IL-10 production (1,115%) when compared to control macrophages (Fig. 3BC and D). Additionally, GL261 and GL261TMZ showed different profiles of nitric oxide production, GL261TMZ have significant increase of 93% in nitric oxide production when compared to the cell line resistant to TMZ (GL261TMZ) (Fig. 3A). Arginase activity and cytokine release were not significantly different in GL261 sensitive or resistant to TMZ (Fig. 3). Taken together, this results suggest that glioma modulates the macrophage through a M2-like polarization and that GL261 TMZ-resistant cells seems to be more effective in induce an immunosuppressive environment when compared to GL261 TMZ-sensitive cells.

Glioma-conditioned medium or co-culture with GL261 or GL261-TMZ alter oxidative stress parameters in macrophage cultures. Subsequently, we investigated whether TMZ-sensitive or resistant glioma cells modulate the activity of antioxidant enzymes and sulfhydryl content. We observed that macrophages exposed to GL261-CM exhibited increased sulfhydryl content and GPx activity (140% and 220%, respectively), while SOD and CAT activities were not changed (Fig. 4) when compared to control macrophages. Macrophage exposition to GL261TMZ-CM increased significantly the antioxidant activity of all enzymes, namely SOD, CAT and GPx (205%, 330% and 305%, respectively) and also increased the sulfhydryl content (275%) when compared to control (Fig. 4). Again, macrophage and glioma co-culture conditions differentially

modulated the oxidative stress parameters when compared to glioma CM treatments. When macrophages were co-cultured with GL261 (GLCC group), no changes were observed in antioxidant enzyme activities and in sulfhydryl content compared to macrophages (Fig. 4). By other hand, macrophages co-cultured with TMZ-resistant GL261 (GL261TMZ-CC group) exhibited increased GPx, SOD, CAT activities and sulfhydryl content (404%, 220% and 250%, respectively) when compared to control macrophages and to GL261-CC (Fig. 4). Notably, the induction of chemoresistance in glioma cells were associated to an upregulation of redox system defenses, since the activity of GPx, SOD and CAT is significantly increased in GL261-TMZ cells (590%, 165% and 190%) when compared to GL261. In addition, macrophages exposed to GLTMZCM or GLTMZCC also acquire these characteristics, which may promote an additional survival advantage, since high free radical levels present in tumor microenvironment may potentially induce cell injury.

Glioma and macrophage crosstalk modulate ectonucleotidase activities and cell proliferation

An important factor that modulates the response mediated by extracellular nucleotides is its metabolism catalyzed by ectonucleotidases. These enzymes are responsible for the control of extracellular nucleotide/nucleoside levels, which control the purinergic receptor activation and the biological effects induced by these signaling molecules [35]. Extracellular nucleotides are well known components of immune/inflammatory responses and also are involved in cancer promoting actions [36]. In a general way, extracellular nucleotide metabolism was decreased in macrophages exposed to CM or co-cultured with glioma cells (Fig. 5). Specifically, the ATP and ADP hydrolysis were decreased in 40% and 35%, respectively, when macrophages were exposed to GL261CM. Similarly, ATP, ADP and AMP hydrolysis were significantly decreased

(45%, 41% and 50%, respectively) in macrophages co-cultured with GL261 (GL261CC group). In contrast, GL261TMZ-CM significantly decreased ADP and AMP hydrolysis in macrophages (43% and 63%, respectively), while co-culture with GL261TMZ (GL261TMZ-CC) decreased ATP, ADP and AMP hydrolysis (71%, 70% and 93%, respectively) when compared to control macrophages and to GLCC group. In addition, GL261 and GL261TMZ showed no significant difference in ectonucleotidase activity, but both glioma cell lines have reduced the ectonucleotidases activity when compared to control macrophages (Fig. 5A, 5B and 5C).

These results suggest that the glioma-macrophage crosstalk modulate the purinergic signaling by decreasing the ectonucleotidase activities which may favor ATP accumulation in the microenvironment. Based in these results, we investigated the effects of extracellular ATP in cell proliferation or toxicity. Macrophage cultures were exposed to CM or co-cultured with glioma cell lines in presence or absence of ATP (0.1 and 1 mM) and the cell proliferation/toxicity was determined by SRB assay following 24 h of treatment. As already reported ATP (1mM) exposition promoted macrophage cell toxicity (23%) (Fig. 5 and 5B). Interestingly, cytotoxicity induced by ATP was abolished when macrophages were exposed to CM (GLCM) or co-cultured with glioma cells (GL261-CC; Fig. 5A). In contrast, the treatment with ATP 1mM in macrophages exposed to GL261TMZ-CM resulted in cytotoxicity when compared to control macrophages. Finally, macrophages co-cultured with GLTMZ (GLTMZCC) remained sensitive to ATP 0.1 and 1.0 mM induced cell death (Fig. 6B). Of note, the sensibility to ATP cytotoxicity may be related to a decreased ability of macrophages, mainly those exposed to GLTMZ cells, to hydrolyze the extracellular nucleotides. In contrast, ATP not promotes significant alterations on GL261 and GL261TMZ cell line growth after 24 h of exposure (Fig. 6A and 6B).

Discussion

In the present study, considering that *in vitro* models of resistance to TMZ are a valuable tool for development of new therapeutic strategies [37], first we developed a murine glioma cell line resistant to TMZ. Resistance in GL261TMZ was confirmed because we observed that TMZ treatment decreased the GL261 cell viability, while did not induce toxicity to GL261TMZ. We further demonstrated that GL261TMZ showed an decreased NO production compared to GL261 and significant higher antioxidant activity by upregulating CAT, SOD and GPx, when compared to control macrophages and GL261.

TMZ induces ROS production in gliomas as a result of DNA damage [38]. However, tumor cells resistant to TMZ under conditions of oxidative stress generate substantially less ROS [21]. One possible explanation may be by increasing antioxidant enzyme activity that our results show. This upregulation of antioxidant enzymes in glioma cells can contribute to their resistance to chemotherapeutic agents that links both oxidative stress and drug resistance, leading to suppressed apoptotic signaling which could disable TMZ damage [39]. Increased activity of SOD, CAT, GPx, and glutathione reductase (GR) in resistant glioma cell line it has already been demonstrated [40-41]. In addition, inducible nitric oxide synthase and nitric oxide (NO) are closely linked to tumor growth, proliferation, angiogenesis, migration and poor prognosis in humans with malignant glioma [42-44]. It has been shown that overexpression of iNOS conferred chemoresistance against chemotherapy in glioma cells [45-46].

The inflammatory process contributes to tumor progression by promoting angiogenesis and immunosuppression, but the molecular and cellular mechanisms involved in cancer-related inflammation and chemoresistance remain unknown. Therefore, we investigated whether glioma cells sensitive or resistant to TMZ impact on important cell pathways involved in macrophage responses, including cell polarization, oxidative stress

parameters and purinergic signaling. We observed that the exposure of macrophages to glioma conditioned medium (GL261-CM) for 24h promoted a significant increase in concentration of nitric oxide and in the release of TNF- α , GPx and sulfhydryl content when compared to control macrophages. Studies have reported that TNF- α potentiated the production of nitric oxide (NO), by increasing expression of the inducible form of nitric-oxide synthase (iNOS) in several types of cells, including macrophages and glioma cells via activation of NF- κ B [47-48] which may explain the increase of NO. The high NO production results in the formation of peroxynitrite via a reaction with superoxide anion, peroxynitrite is a potent oxidant [49], GPx constitute an efficient system for peroxynitrite reduction [50] which may contribute to protect macrophage oxidative stress, promoting an increase in sulfhydryl content. In addition, iNOS and TNF- α are involved in the inflammatory process and corresponds to a marker M1 phenotype. [51-52]. Previous studies have shown that *in vivo* macrophages infiltrating glioma are evident at 5 days after tumor implantation, however, they do not express detectable levels marker of M2. Arginase increases over time communication [53]. Thus the exposure to glioma CM for 24h may have been insufficient time for M2 polarization.

When macrophages are exposed to conditioned GL261TMZ-CM there is a decreased production of nitric oxide, significant increase of arginase activity, IL-10 secretion, SOD, CAT, GPx activities and sulfhydryl content when compared to control macrophages, marker of M2 that take tumor promotion [32-34]. These alterations may contribute to glioma immune escape favoring chemoresistance.

ATP, ADP and adenosine play important role in modulation of immune/inflammatory responses [36]. Therefore, our second aim was to investigate the role of the purinergic system in the crosstalk between macrophages and glioma cells. Our results showed that crosstalk with GL261-CM and GL261-CC modulate negatively activity of

ectonucleotidases decreasing the ATP and ADP hydrolysis. Additionally, GL261TMZ-CM significantly decreased ADP and AMP hydrolysis in macrophages, while co-culture with GL261TMZ GL261-CC decreased ATP, ADP and AMP hydrolysis when compared to control macrophages. We can suggest that the decreased nucleotide metabolism may promote ATP accumulation a pro-inflammatory molecule and prevents the increase in adenosine levels an anti-inflammatory molecule. Glioma cells exhibit low rates of hydrolysis of ATP and ADP in comparison with normal cells [54]. This ATP acts as favoring the recruitment of macrophages to the tumor site and promotes an inflammatory response with the production of pro-inflammatory cytokines, promotes tumor progression and invasion [55-57]. Therefore could act maintaining this malignancy of tumor, pro-inflammatory microenvironment and infiltrate of macrophages.

References

1. Kleihues P, Soylemezoglu F, Schäuble B, Scheithauer BW, Burger PC. Histopathology, classification and grading of gliomas. *Glia*. 1995; 15: 211-21.
2. Fine, HA. The basis for current treatment recommendations for malignant gliomas. *J. Neurooncol*. 1994; 20: 111: –20.
3. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MRA, Chakravarti. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 4127-36.
4. Huse JT. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 319-31.
5. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10: 248-56.
6. Zhai H, Heppner FL, Tsirka SE. Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia*. 2011; 59: 472–85.
7. Badie B, Schartner J. Role of microglia in glioma biology. *Microsc. Res. Tech*. 2001; 54: 106–13.
8. Klimp AH, De vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical Reviews in oncology/Hematology*. 2002; 44: 143-61.
9. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *Journal of Pathology*. 2008; 216: 15–24.
10. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007; 117: 1175-83.
11. Watters JJ, Schartner JM, Badie B. Microglial function in brain tumors. *J Neurosci Res*. 2005; 81: 447-55.

12. Hussain SF, Yang D, Suki D, Grimm E, Heimberger AB. Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients. *J. Transl.Med.* 2006; 4: 15.
13. Shurin MR, Salter RD. *Dendritic cells in Cancer*. 1a. Ed. Springer, 2009.
14. Zhang L, Liu W, Alizadeh D. S100B attenuates microglia activation in gliomas: possible role of STAT3 pathway. *GLIA*. 2011; 59: 486-98.
15. Domingues P, González-Tablas M, Otero Á, Pascual D, Miranda D, Ruiz L, Sousa P, Ciudad J, Gonçalves JM, Lopes MC, Orfao A, Tabernero MD. Tumor infiltrating immune cells in gliomas and meningiomas. *Brain Behav Immun.* 2015; 15; 00414-46.
16. Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppkes D, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AM. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. *Cancer Science*. 2009; 100: 1434-42.
17. Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signalling*. 2013; 9: 491-540.
18. Zimmermann, H. Signalling via ATP in the nervous system. *Trends in Neurosciences*. 1994; 17: 420-26.
19. Bergamin LS, Braganhol E, Figueiró F, Casali EA, Zanin RF, Sévigny J, Battastini AM. Involvement of purinergic system in the release of cytokines by macrophages exposed to glioma-conditioned medium. *J Cell Biochem*. 2015; 116: 721-29.
20. Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rébé C. Production of Adenosine by Ectonucleotidases: A Key Factor in Tumor Immunoescape. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012.
21. Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG, Sarkaria JN, Markert JM, Darley-Usmar VM, Bailey SM, Gillespie GY, Landar A, Griguer CE. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2010; 285: 39759–67.

22. Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, Campesato LF, Filho AZ, Moreira JC, Morrone FB, Sévigny J, Schetinger MR, de Souza Wyse AT, Battastini AM. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS One*. 2012; 7: e31205.
23. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*. 1994; 174: 23135.
24. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*. 1989; 169: 1543-55.
25. Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca-ATPase activity. *Anal Biochem*. 1986; 157: 375-80.
26. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
27. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 121-26.
28. Misra H P, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1972; 247: 3170-75.
29. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes on the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 2001; 302: 141-45.
30. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.
31. Gurbuxani E, Solary B, Chauffert F, Martin. Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system, *J. Immunol*. 2001; 167: 5077-83.

32. Mytar B, Siedlar M, Wolosyn M, Ruggiero I, Pryjama J, Zembala M. Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumor cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. *Br. J. Cancer*. 1999; 79: 737-43.
33. Mantovani A. Orchestration of macrophage polarization. *Blood*. 2009; 114: 3135-36.
34. Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the Best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*. 2006; 211: 487-501.
35. Zimmermann, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*. 2001; 52: 44-56.
36. Burnstock G. Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res*. 2009; 42: 3-8.
37. Gazdar AF, Girard L, Lockwood WW, Lam WL, Minna JD. Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *J. Natl. Cancer Inst*. 2010; 102: 1310–32.
38. Zhang WB, Wang Z, Shu F, Jin YH, Liu HY, Wang QJ, Yang Y. Activation of AMP-activated protein kinase by temozolomide contributes to apoptosis in glioblastoma cells via p53 activation and mTORC1 inhibition. *J Biol Chem*. 2010; 285: 40461–71.
39. Ria F, Landriscina M, Remiddi F, Rosselli R, Iacoangeli M, Scerrati M, Pani G, Borrello S, Galeotti T. The level of manganese superoxide dismutase content is an independent prognostic factor for glioblastoma. Biological mechanisms and clinical implications. *Br. J. Cancer*. 2001; 84: 529–34.
40. Lee HC, Kim DW, Jung KY, Park IC, Park MJ, Kim MS, Woo SH, Rhee CH, Yoo H, Lee SH, Hong SI. Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line. *Int J Mol Med*. 2004; 13: 883–87.

41. Zhong W, Yan T, Lim R, Oberley LW. Expression of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in glioma cells. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27: 1334–45.
42. Kostourou V, Cartwright JE, Johnstone AP, Boulton JK, Cullis ER, Whitley G, Robinson SP. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *Br J Cancer*. 2011; 13:83–90.
43. Jadeski LC, Chakraborty C, Lala PK. Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int J Cancer*. 2003; 13: 496–504.
44. Ridnour LA, Windhausen AN, Isenberg JS, Yeung N, Thomas DD, Vitek MP, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 16898–903.
45. Yang D, Yin JH, Mishra S, Mishra R, Hsu CY. NO-mediated chemoresistance in C6 glioma cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2002; 962: 8-17.
46. Yang D, Yin J, Mishra S, Mishra R, Hsu CY. Nitric oxide and BCNU chemoresistance in C6 glioma cells : role of S-nitrosoglutathione. *Free Radic. Biol. Med*. 2004; 36: 1317-28.
47. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase an FAD-and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 7773-77.
48. Kwon G, Corbett JA, Rodi CP, Sullivan P, McDaniel ML. Interleukin-1 β -induced nitric oxide synthase expression by rat pancreatic β -cells: Evidence for the involvement of nuclear factor κ B in the signalling mechanism. *Endocrinology*. 1995; 136: 4790–95.

49. Irmak MK, Fadillioglu E, Sogut S, Erdogan H, Gulec M, Ozer M, Yagmurca M, Gozukara ME. Effects of caffeic acid phenethyl ester and alpha-tocopherol on reperfusion injury in rat brain. *Cell Biochemistry and Function*. 2003; 21: 283–89.
50. Selles B, Hugo M, Trujillo M, Srivastava V, Wingsle G, Jacquot JP, Radi , Rouhier N. Hydroperoxide and peroxynitrite reductase activity of poplar thioredoxin-dependent glutathione peroxidase 5: kinetics, catalytic mechanism and oxidative inactivation. *Biochem J*. 2012; 1: 369-80.
51. Sayed-Aimed MM. Increased plasma endothelin-1 and cardiac nitric oxide during doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Pharmacology and Toxicology*. 2001; 89: 140–44.
52. Pacher P, Liaudet L, Bai P, Mabley JG, Kaminski PM, Virág L, Deb A, Szabó E, Ungvári Z, Wolin MS, Groves JT, Szabó C. Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation*. 2003; 107: 896-904.
53. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*. 2008; 18: 349-55.
54. Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartsmann G, Sarkis JJ, Battastini AM. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer letters*. 2003; 198: 211-18.
55. Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJ, Salbego CG, Lenz G, Battastini AM. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *Journal of neuro-oncology*. 2005; 71: 135-40.
56. Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, Bernardi A, Schwartsmann G, Rodnight R, Lenz G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase

nucleoside transport in human glioma cell lines. *Journal of neuro-oncology*. 2003; 64: 211-18.

57. Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA. Secretion of IL2 and INF γ , but not IL4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *The Journal of Immunology*. 2003; 170: 2962-70.

Legend to Figures

Fig 1 Experimental protocol applied in the present study. GL261 glioma cell line resistant to temozolomide (TMZ) was developed by exposing cells to increasing TMZ concentrations through a period of 6 months. The resistance phenotype was maintained by culturing GL261-TMZ in presence of 160 μ M TMZ. To evaluate macrophage-glioma crosstalk, two experimental conditions were applied: *i*) macrophage cultures were exposed to GL261 or GL261 resistant to TMZ conditioned medium (GL-CM and GLTMZ-CM, respectively) which was previously prepared; or *ii*) macrophages were co-cultured with GL261(GLCC) or GL261TMZ (GLTMZCC). The experiments were performed 24 h following expositions.

Fig 2 Comparative cytotoxicity of TMZ against GL261 and GL261-TMZ glioma cell lines. Glioma cells were exposed to increasing TMZ concentrations and the cell viability was determined by MTT following 48 h (A) and 72 h (B) of treatment. Legends: C (DMSO); TMZ (temozolomide). Values represent the mean $\pm$ SD from three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by *post hoc* comparisons (Tukey-Kramer test). **, *** Significantly different from GL261 control cells ($p < 0,01$ and $0,001$, respectively).

Fig3 Characterization of macrophage polarization following exposure to glioma conditioned medium (CM) or co-cultured (CC) with GL261 and GL261TMZ for 24 h. (A) iNOS activity (B) Arginase activity (C) TNF- α and (D) IL-10 release. Values represent the mean $\pm$ SD from three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by *post hoc* comparisons (Tukey-Kramer test). ^ASignificantly different from macrophage cells, ^BSignificant difference between

GL261-CM and GL261-CC, ^CSignificant difference between GL261TMZ-CM and GL261TMZ-CC, ^DSignificant difference between GL261 and GL261TMZ ($p < 0.05$).

Fig4 Oxidative stress parameters was estimated in lysates macrophage following exposure to glioma conditioned medium (CM) or co-cultured (CC) with GL261 and GL261TMZ for 24h. (A) Total thiol content (B) GPx activity (C) SOD activity (D) CAT activity. Values represent the mean $\pm$ SD from three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post hoc comparisons (Tukey-Kramer test). ^ASignificantly different from macrophage cells, ^BSignificant difference between GL261-CM and GL261-CC, ^CSignificant difference between GL261TMZ-CM and GL261TMZ-CC, ^DSignificant difference between GL261 and GL261TMZ ($p < 0.05$).

Fig5 Analysis of ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in cultured macrophages exposed to glioma conditioned medium (CM) or co-cultured (CC) with GL261 and GL261TMZ for 24h. Data represent means $\pm$ SD of at least three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post hoc Tukey- Kramer. ^ASignificantly different from macrophage cells, ^BSignificant difference between GL261-CM and GL261-CC, ^CSignificant difference between GL261TMZ-CM and GL261TMZ-CC, ^DSignificant difference between GL261 and GL261TMZ ($p < 0.05$).

Fig6 Analysis of cytotoxicity in cultured macrophages exposed to glioma conditioned medium (CM) or co-cultured (CC) with GL261 (A) and GL261TMZ (B) after treatment with ATP for 24 h. cytotoxicity was assessed by SRB. Data represent means $\pm$ SD of at least three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed by

ANOVA followed by *post hoc* Tukey- Kramer . ^A Significantly different from macrophage cells, ^B Significant difference between treatment with ATP ($p < 0.05$).

Figure 1

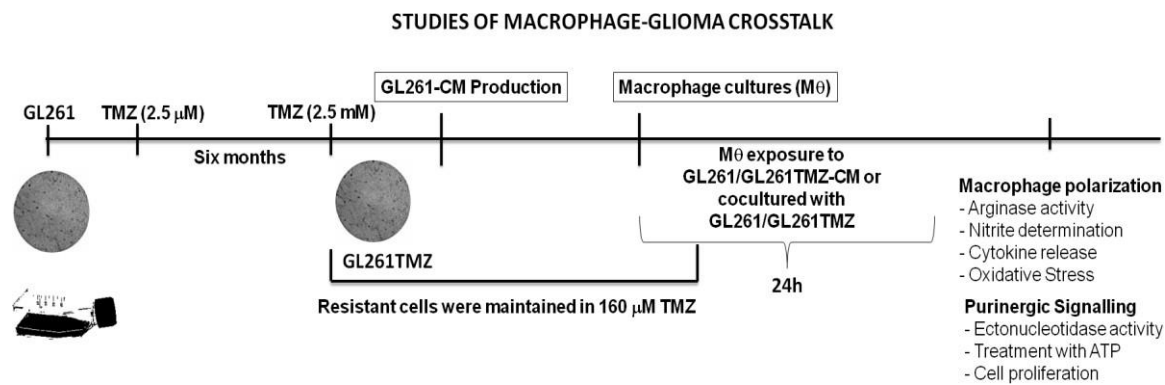
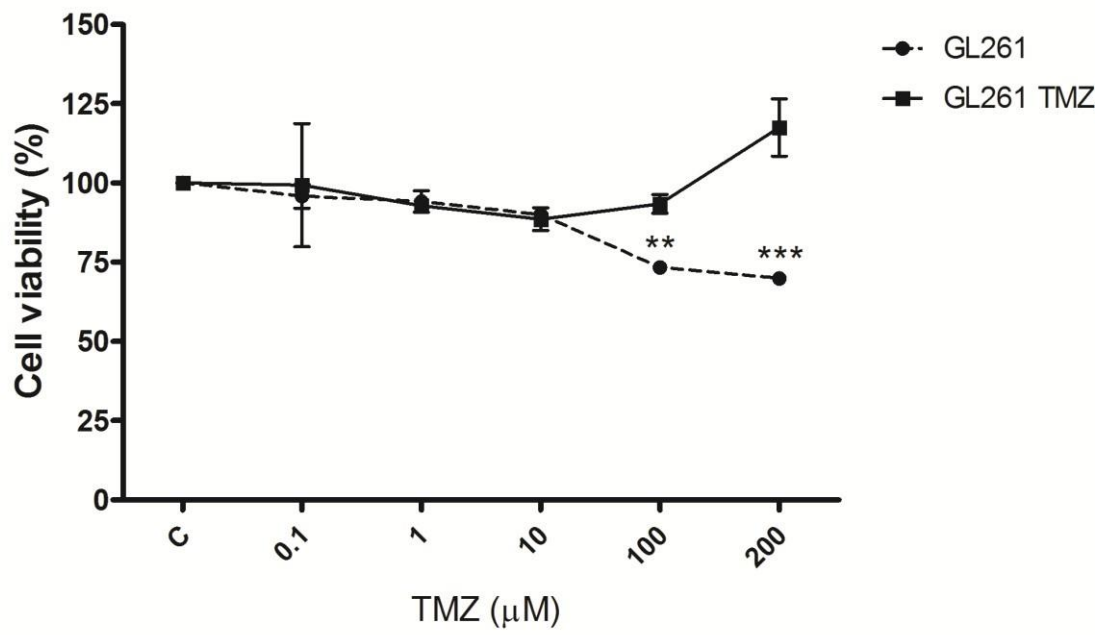


Figure 2

A



B

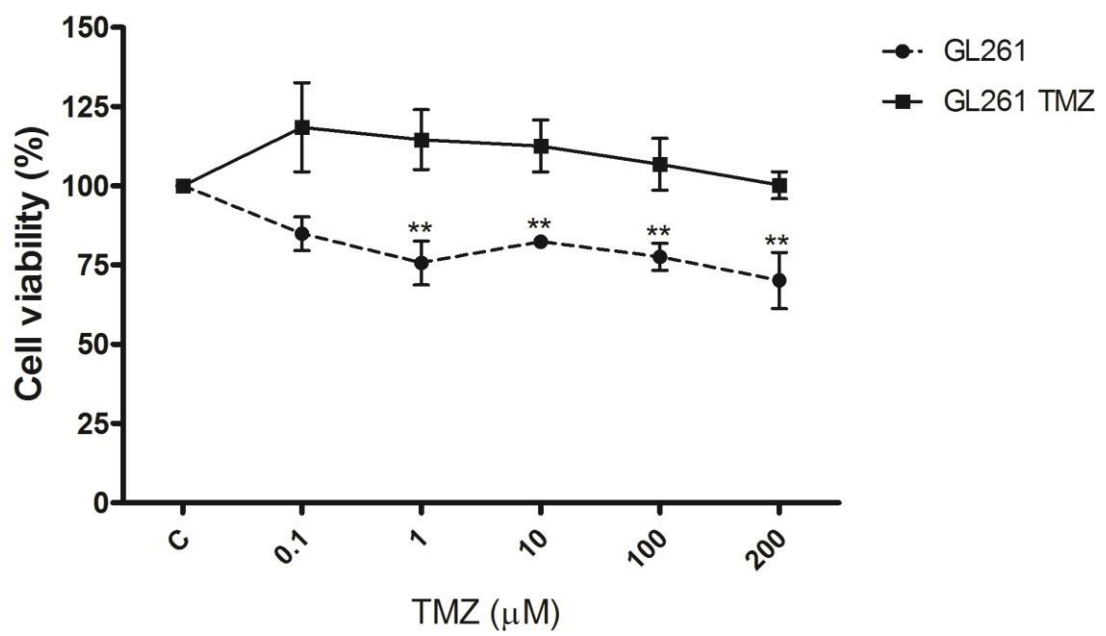


Figure 3

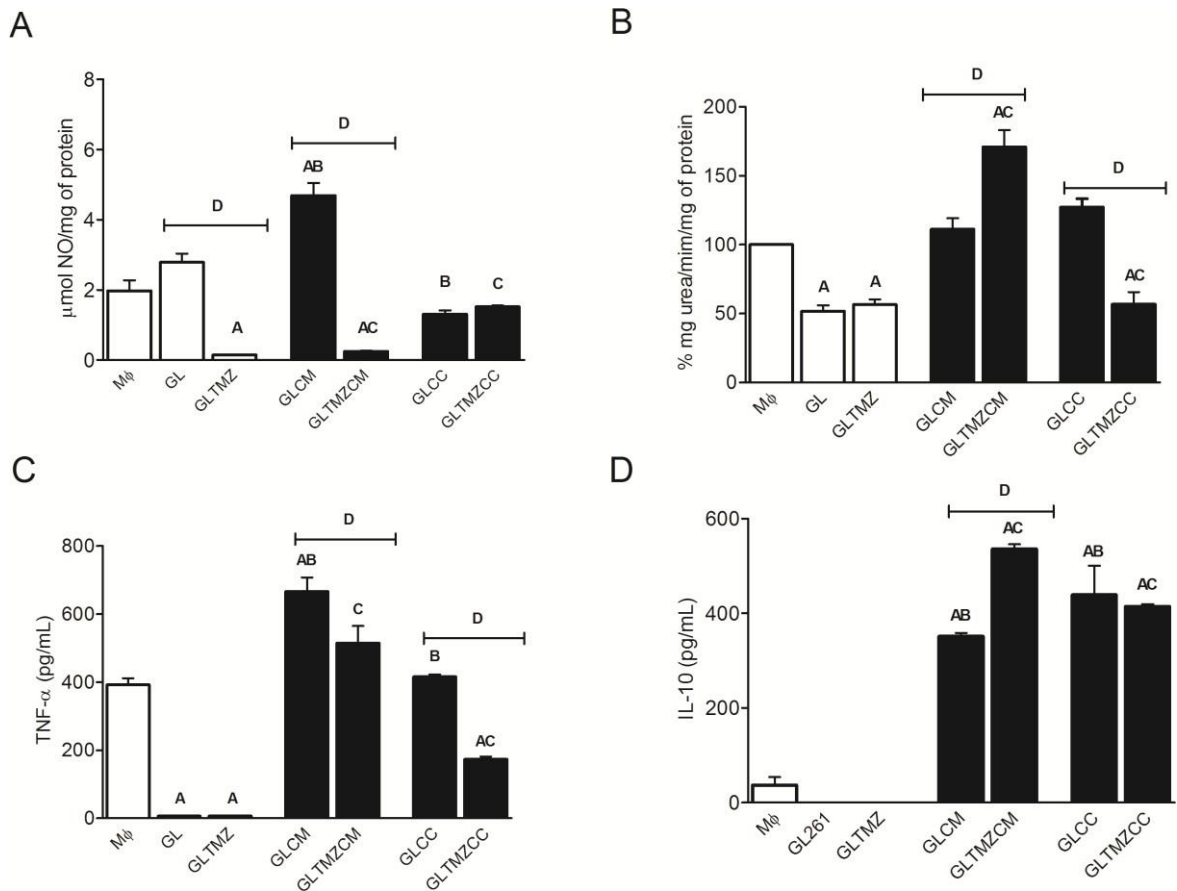


Figure 4

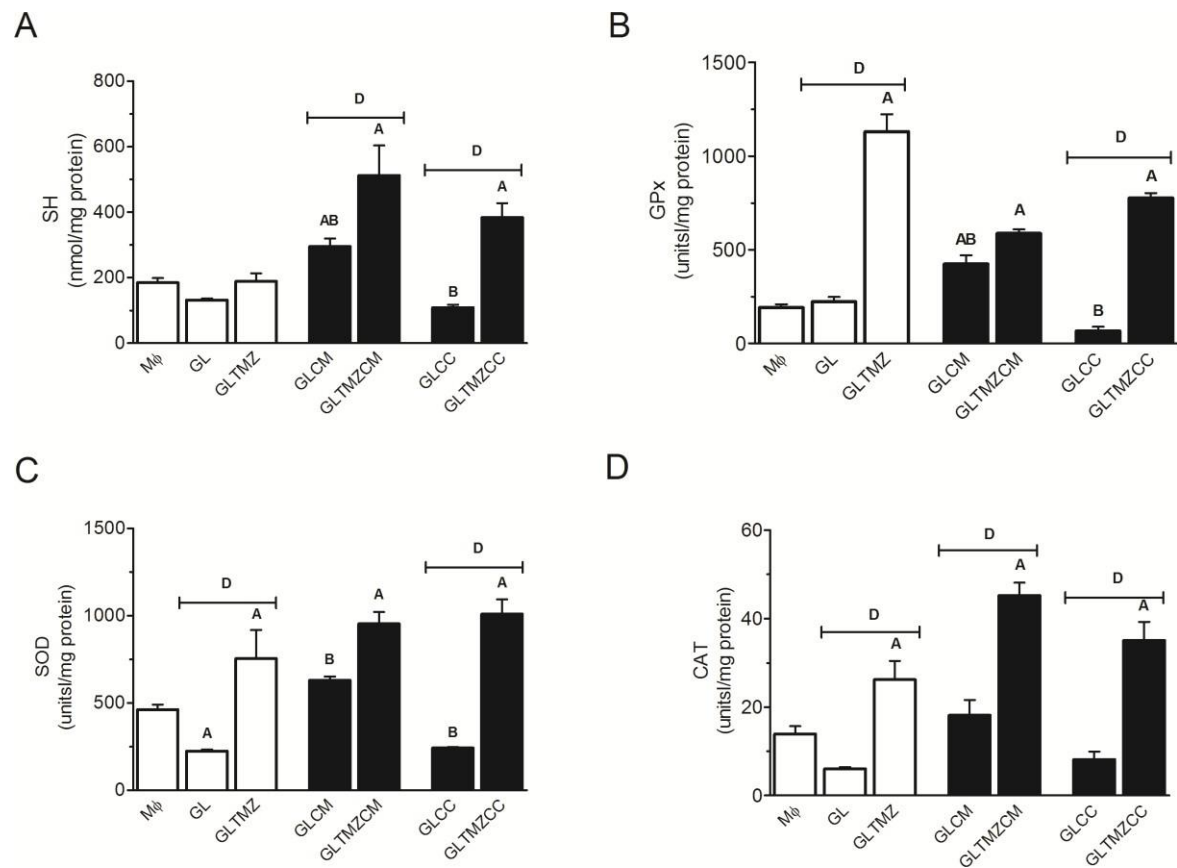


Figure 5

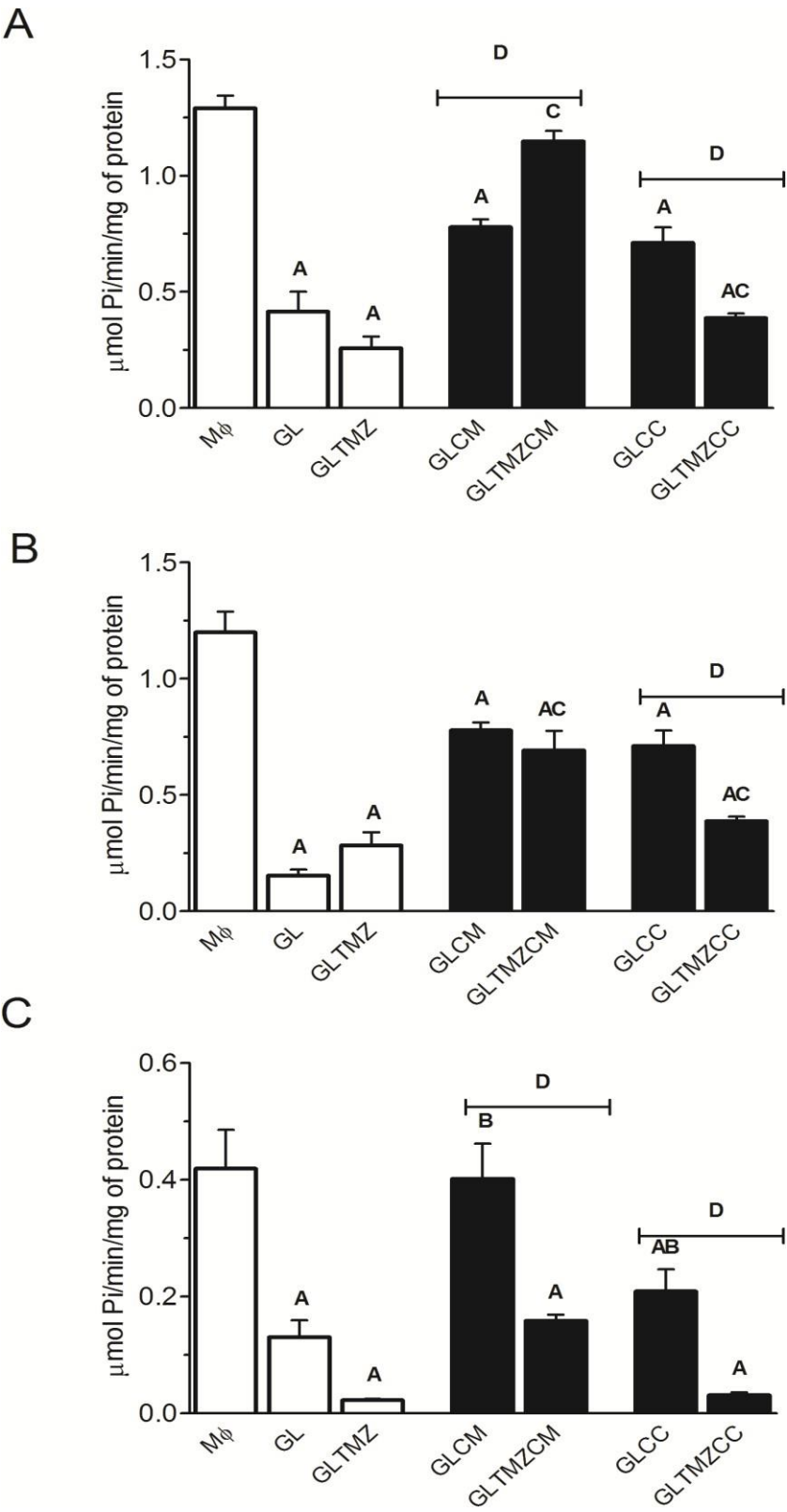
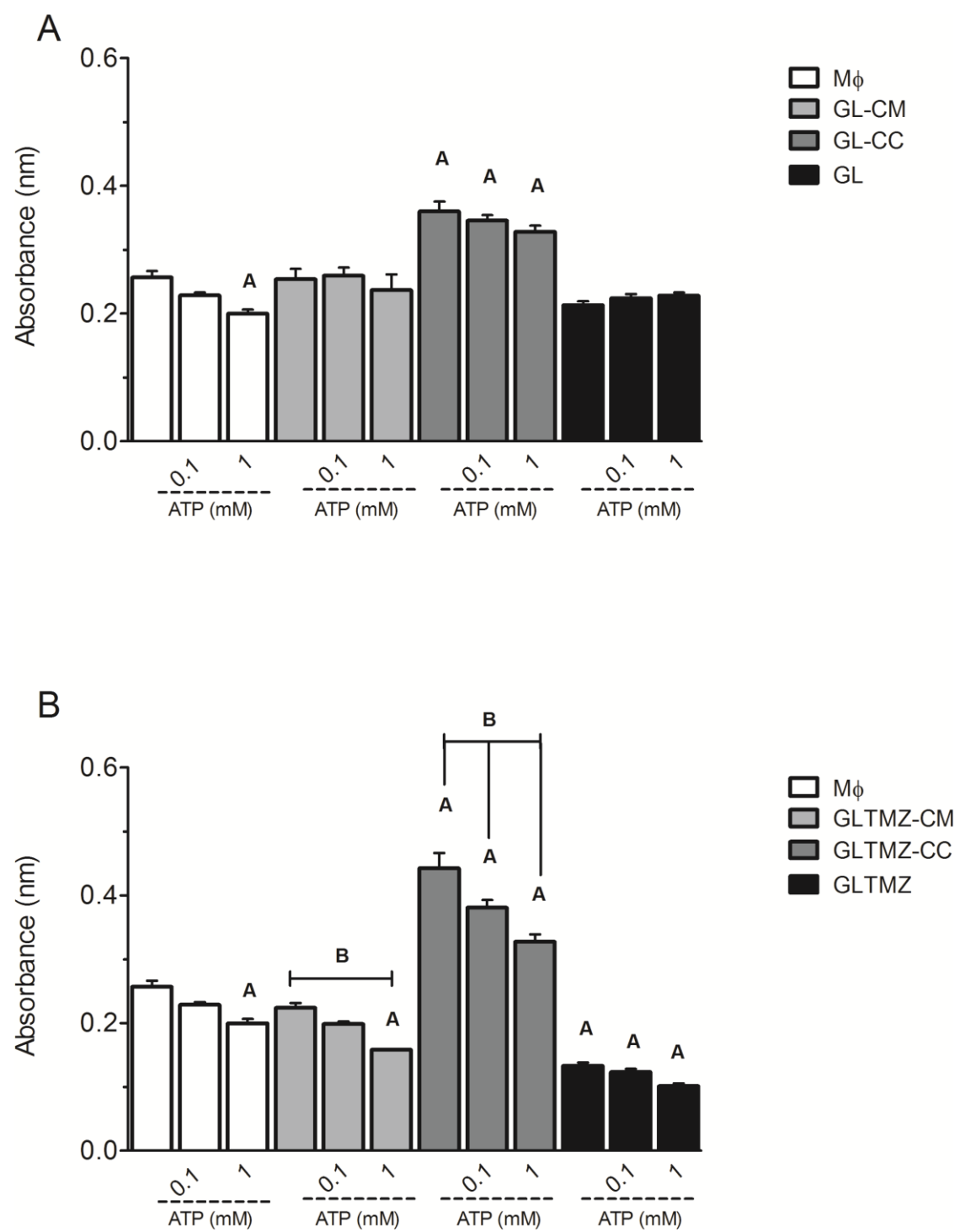


Figure 6



5. Conclusões

Sabendo que o TMZ causa um aumento das ERO no meio extracelular devido ao seu mecanismo de ação, acreditamos que o aumento encontrado nas enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx pode estar contribuindo para a diminuição destas espécies, levando a resistência a morte celular e diminuição da sensibilidade ao TMZ favorecendo a quimioresistência. Além disso, nossos achados demonstram que os macrófagos também são estimulados pelas células quimioresistentes a aumentar sua atividade das enzimas antioxidantes atuando de maneira a favorecer a resistência à quimioterapia.

Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que macrófagos são estimulados através da comunicação com as células de glioma a assumir um fenótipo tipo-M2 e que células resistentes ao TMZ parecem ser mais eficazes em induzir um ambiente imunossupressor quando em comparação com células sensíveis favorecendo o escape da vigilância imunológica.

A comunicação entre macrófagos e glioma leva a alterações no sistema purinérgico e decréscimo na hidrólise do ATP, ADP e AMP. O ATP no meio extracelular pode estar favorecendo o recrutamento de macrófagos para o sítio tumoral e a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, a progressão tumoral, com aumento da capacidade invasiva e malignidade tumoral. Além disto, sugerimos que a expressiva diminuição da atividade das ectonucleotidases encontrado quando os macrófagos se comunicam com as células de glioma resistentes leva a um aumento da sensibilidade a citotoxicidade induzida pelo ATP.

Nossos resultados sugerem que as alterações nas atividades das enzimas antioxidantes, dos níveis das citocinas pró- e antiinflamatórias, das enzimas do sistema purinérgico e da sensibilidade a citotoxicidade induzida pelo ATP, podem contribuir para melhor compreender as alterações do sistema imunológico causadas pela interação com as células de glioma sensíveis ou resistentes ao TMZ. Em conclusão, demonstrou-se que as alterações destes parâmetros apoiam a ideia de que os gliomas atuam de maneira a educar os macrófagos a exercer funções pró-tumorais. Além disto, nossos resultados podem auxiliar no desenvolvimento de imunoterapias para pacientes com gliomas.

5. Bibliografia

Abbas, AK, Lichtman AH, Pober, J. Cellular and Molecular Immunology - Saunders Company, 4 a edição, USA, 2001.

Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. **Drugs**. v. 58, p. 211-232, 1999.

Alberts et al. Biologia Molecular da Célula, 3a Ed. Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.

Badie B, Schartner J. Role of microglia in glioma biology. **Microsc. Res. Tech**, v. 54, p. 106-113, 2001.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol Ther**. v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppes D, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AM. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. **Cancer Science**, v.100, n.8, p.1434-1442, 2009.

Braganhol, E. Sistema purinérgico e a progressão dos gliomas: avaliação de parâmetros proliferativos e inflamatórios. 2010. Tese doutorado em Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

Burger PC, Cohen KJ, Rosenblum MK, Tihan T. Pathology of diencephalic astrocytomas. **Pediatr Neurosurg**, v. 32, n.4, p. 214-9., 2000.

Burnstock G. Purinergic signalling: past, present and future. **Braz J Med Biol Res**. v.42, n.1, p.3-8. 2009.

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

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

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

Classen A, Lloberas J, Celada A. Macrophage activation: classical versus alternative. **Methods Mol Biol,** v. 10, 978 - 1007.

da Silva ER, da Silva MF, Fischer H, Mortara RA, Mayer MG, Framesqui K, Silber AM, Floeter-Winter LM. Biochemical and biophysicaal proprties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. **Mol Biochem Parasitol,** v. 159, n.2, p. 104-111.

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

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

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

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

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

Fu, D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature reviews Cancer**, v. 12, p. 104-120, 2012.

Grody, WW, Dizikes GJ. Human arginase isozymes. **Isozymes Curr Top Biol Med Res**, v. 13, p 181-214.

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

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

Hansen RJ, Ludeman SM, Paikoff SJ, Pegg AE, Dolan ME. Role of MGMT in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity in cells and animals. **DNA Repair**, p.6, n,1145-1154, 2007.

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

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

Hecker M, Nematollahi H, Hey C, Busse R, Rack C. Inhibition of arginase by N-G-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: Implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. **FEBS Letters**. v. 359, p. 251-254, 1995.

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

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

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

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

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

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. 2015.

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

Johnson, DR. O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. **J Neurooncol**, v. 107, n. 2, p. 359-64, 2012.

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

Junger, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p.201-212, 2011.

Kiefer R, Supler ML, Toyka KV, Streit WJ. In situ detection of transforming growth factor- β mRNA in experimental rat glioma and reactive glial cells.

Neuroscience Letters, v. 166, n. 2, p. 161-164, 1994.

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

Kleihues P, Sobin LH. World Health Organization classification of tumors.

Cancer, v. 88, n.12, p. 2887, 2002.

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

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

Koukourakis GV, Kouloulis V, Zacharias G, Papadimitriou C, Pantelakos P, Maravelis G, Fotineas A, Beli I, Chaldeopoulos D, Kouvaris J. Temozolamide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceutical considerations and efficacy; a review article. **Molecules**, v.14, p. 1561- 1577, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

Loibl S, Von minckwitz G, Weber S, Sinn HP, Schini-kerth VB, Lobysheva L, Nepveu F, Wolf G, Strebhardt K, Kaufmann M. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in benign and malignant lesions of the breast and measurement of nitric oxide using electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Cancer, Philadelphia.** v. 95, n. 6, p. 1191-1198, 2002.

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

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

Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. **J Exp Med**, v. 212, n.4, p. 435-445.

Mantovani A, Sica Am Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in immunology**, v. 25, p. 677-686, 2004.

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

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

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

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

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

Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. **Trends Immunol**, v. 36, n.4, p. 229-239.

Ralevic, V; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev**, v. 50, p. 413-492, 1998.

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

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

Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Stricture function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic. Signal.** v. 2, p. 409-30, 2006.

Satriano, J. Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines: Review article. **Amino Acids, Wien.** v. 26, p. 321-329, 2004.

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

Sitkovsky MV, Ohta A. The “danger” sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors?. **Trends Immunol.** v. 26, n. 6, p. 299-304, 2005.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, Van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide *versus* radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-Year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncol**, v, 10, p. 459-466, 2009.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England journal of medicine**, v.352, n.10, p.987-996, 2005.

Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. **J Immunol**, v. 172, n.7, p, 4410-4417.

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

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

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

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

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

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

Zaboikin, M, Srinivasakumar, N, Schuening, F. Gene therapy with drug resistance genes. **Cancer Gene Therapy**, v. 13, p. 335-345, 2006.

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

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

Zhang, J, Stevens, MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. **Curr Mol Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 102-14, 2012.

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

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

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

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

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



Pelotas, 18 de Dezembro de 2012

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Professora Elizandra Braganhol

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Senhora Professora:

A CEEA analisou o adendo do projeto intitulado: “**Estudo do envolvimento dos Toll-Like Receptors (TLRs) na quimioresistência em Gliomas**”, processo nº23110.007092/2012-59, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 7092).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 15 / 01 / 2013

Assinatura da Professora Responsável: