

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA e CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO E FUNCIONALIDADE DO RECEPTOR P2X7 EM  
LINHAGEM DE GLIOMA DE CAMUNDONGO GL261

ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências.

Orientador

PROF<sup>o</sup> DR<sup>o</sup> GUIDO LENZ

Co-orientadora

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MÁRCIA ROSÂNGELA WINK

Porto Alegre

Maio, 2010

## **I. INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

### **INSTITUIÇÕES**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Departamento de Biofísica UFRGS

Departamento de Bioquímica UFRGS

Centro de Biotecnologia UFRGS

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE – HCPA

Laboratório de Patologia Clínica

Laboratório de Pesquisa em Oncologia

### **FONTES FINANCIADORAS**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul – FAPERGS;

Projeto Número: 0410419

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq;

Projeto Número: 473190/2004

Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de

Porto Alegre;

Projeto Número: 08-259

## II. AGRADECIMENTOS

Ao **CNPq**, pelo financiamento da minha formação com as bolsas de mestrado e doutorado e pelo financiamento do projeto.

À **FAPERGS**, pelo financiamento principal do projeto original desta tese e pela minha formação também com a bolsa de iniciação científica.

Ao meu orientador **Guido**, pela grande oportunidade de compartilhar de suas eloquentes ideias, espírito científico e protocolos em desenhos esquemáticos. Pelo aprendizado na construção de um laboratório e pelo incentivo na padronização das técnicas necessárias para este trabalho. Pela ética e pela liberdade na condução desse trabalho e pela amizade construída ao longo desses anos de convivência.

À minha co-orientadora **Márcia**, por contribuir na minha formação desde a iniciação científica, sempre de maneira incansável. Pelas sugestões, pelas leituras, pelo exemplo de persistência e pela disponibilidade, até mesmo quando veio a Laurinha. Principalmente, pela amizade, pelo carinho e pela torcida.

Às minhas bolsistas **Rô** (Romela Paulus da Rosa) e **Franciele** (Franciele C. Kipper), pela dedicada e eficiente ajuda nos experimentos, pela divertida convivência, pelas trocas científicas. O excelente trabalho que sempre fizeram é a base da minha plena confiança naquilo que fazem cientificamente.

À Prof<sup>a</sup> **Ana M. O. Battastini**, por estar presente desde o início da minha formação, pelas primeiras oportunidades na vida científica, pela orientação, pela sinceridade e disponibilidade com que sempre me atendeu.

Ao Prof<sup>o</sup> **Robson Coutinho-Silva**, à Prof<sup>a</sup> **Luise Meurer**, ao Prof<sup>o</sup> **Rafael Roesler** e à colega **Débora G. Flores**, pelas frutíferas colaborações nos artigos desta tese.

Aos meus mais que queridos colegas de laboratório **Lauren, Ale, Pítia, Gabi, José, Beta** e especialmente **PatiLu, Dudu, Emilly, Andrew e Gleice**, que me ajudaram em alguns experimentos, obrigada pela preciosa convivência, pelas discussões científicas e não-científicas, pelos amigo-secretos, pelos emails em portunhol, por compartilharem protocolos e reagentes, pela solidariedade na falta de luz e pelo divertidíssimo ambiente de trabalho.

Aos colegas do laboratório 103, Prof<sup>a</sup> **Fabiana Horn, Letícia, Nicolle, Roberta e Daniel** pela tranquila convivência, amizade e empréstimo de equipamentos e reagentes.

A todos os **professores, colegas e funcionários** que me ajudaram de alguma maneira.

À **Sílvia** e ao **Luciano**, que tornam as necessidades burocráticas mais simples e pela eficiência e disponibilidade de seus trabalhos.

A minha grande amiga **Eliz** (Elizandra Braganhol), pela amizade, pelo carinho e torcida.

A toda **família Neis**, pela querida acolhida nas suas casas e nas suas vidas, pela torcida, pelos exemplos, pelo apoio, sobretudo neste momento final da escrita da tese. Especialmente, agradeço ao **Fernando** e à **Miriam** por disponibilizarem o notebook, alívio no momento mais difícil desse trabalho; obrigada pela confiança e despojamento. E à minha afilhada **Ana Lúcia**, cujo entusiasmado sorriso me incentivou durante toda a escrita.

À minha comunidade **Nos Passos do Mestre** e amigos NPM, pelas preciosas intercessões, pelas amizades mais profundas, pelo sustento na caminhada, pelo apoio na busca da Verdade.

À minha família, meus pais **Jorge e Elisa** e minha irmã **Simone**, por me ensinarem os valores da vida, por me proporcionarem caminhos de sabedoria, por me incentivarem na luta, mas principalmente, pelo carinho, doação, dedicação e amor.

Ao **Cado**, incondicional amor, que tudo crê, tudo espera e tudo suporta.

A Deus, Senhor e **Mestre**, Caminho, Verdade e Vida.

### III. ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1	<i>Introdução ao Sistema Purinérgico</i> .....	12
1.2	<i>Histórico do receptor P2Z / P2X7</i> .....	16
1.3	<i>Estrutura do receptor P2X7</i> .....	17
1.4	<i>Farmacologia do Receptor P2X7</i> .....	22
1.5	<i>Expressão no SNC e funções</i> .....	24
1.6	<i>Expressão em Câncer</i> .....	27
1.7	<i>Gliomas: Descrição e incidência</i> .....	29
1.8	<i>Invasão: adesão e migração</i> .....	33
1.9	<i>Modelo do sistema purinérgico em glioblastomas</i> .....	35
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULOS – ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	<b>40</b>
3.1	<i>Capítulo 1</i> .....	40
3.2	<i>Capítulo 2</i> .....	53
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>72</b>
4.1	<i>GL261, uma linhagem de glioblastoma de camundongo sensível ao ATP extracelular</i> .....	72
4.2	<i>Caracterização farmacológica e molecular do receptor P2X7 na morte celular induzida por ATP em GL261</i> .....	73
4.3	<i>Tipo de morte celular induzida por ATP na GL261</i> .....	75
4.4	<i>P2X7 como uma proteína supressora tumoral</i> .....	77
4.5	<i>P2X7 no modelo purinérgico para o envolvimento do ATP extracelular no crescimento tumoral</i> .....	79
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>81</b>
5.1	<i>GERAIS</i> .....	81
5.2	<i>ESPECÍFICAS</i> .....	81
5.3	<i>PERSPECTIVAS</i> .....	82
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>CURRICULUM VITÆ</b> .....	<b>94</b>

#### IV. LISTA DE ABREVIATURAS

2meSATP - 2 metil tio ATP

5'-NT/CD73 - Ecto 5'-Nucleotidase

ADP - Adenosina Difosfato

AKT/PKB - *Protein Kinase B* / Proteína Quinase B

AMP - Adenosina Monofosfato

ATP - Adenosina Trifosfato

ATP $\gamma$ S - Adenosina Tiotrifosfato

BzATP - Benzoil ATP

CDK - *Cyclin-dependent Kinases* / Quinase Dependente de Ciclina

cDNA - DNA complementar

c-myc - Nome de Fator de Transcrição

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidermal

E-NPPs - Ecto Nucleosídeo Pirofosfatases Fosfodiesterases

E-NTPDases/CD39 - Ecto Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases

ERK - *Extracellular Signal Regulated Kinase*

FGFR - Receptor do fator de crescimento de fibroblastos

G $_i$ /G $_o$  - Proteína G inibitória

G $_q$ /G $_{11}$  - Proteína G ativadora de PLC-  $\beta$

Gs - Proteína G estimulatória

HE – Hematoxilina-Eosina

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Hsc - Proteína Cognato de Choque Térmico

Hsp - *Heat Shock Protein* / Proteínas de Choque Térmico

ICAMs - Moléculas de Adesão Celular Intercelular

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta

INK4A-ARF - Locus do cromossomo 9 que gera dois produtos alternativos p16(INK4a) e p19(ARF)

IP - Iodeto de Propídeo

LC3-II - Proteína localizada na membrana de Autofagolisossomos

LDH - Lactato Desidrogenase

IkappaB- $\alpha$  - Inibidor do fator de transcrição NF-kappaB

LPS - Lipopolissacarídeo

MAGuK - Guanilato Quinase P55 associada a membrana  
MCP-1 - *Monocyte chemotactic protein-1*  
MDM2 - *Murine Doble Minute 2* (regulador negativo de p53)  
MEC - Matriz Extracelular  
MMPs - Metaloproteinases  
MTT - *Dimethylthiazol- diphenyltetrazolium*  
NCAMs - Moléculas de Adesão Celular Neural  
oATP - ATP oxidado  
P2X7 KD - *P2X7 KnockDown* / P2X7 silenciada  
p53 - Proteína supressora tumoral de 53 Da  
PARP - *Poly (ADP-ribose) polymerase*  
PDGFR - Receptor do fator de crescimento de plaquetas  
PI3K - Fosfatidil-inositol-3-quinase  
PI4K - Fosfatidilinositol-4-quinase  
PLC-  $\beta$  - Fosfolipase C beta  
PTEN - *Phosphatase and tensin homolog* / Fosfatase e homólogo da tensina  
RAS/MAPK - *Mitogen-activated Protein Kinase*  
RB - Proteína Retinoblastoma  
RPTP $\beta$  - Receptor da proteína tirofosfatase-beta  
RT-PCR - *Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction*  
SNC - Sistema Nervoso Central  
STAT - *Signal Transducers and Activators of Transcription Protein*  
TNF- $\alpha$  - *Tumor Necrosis Factor* / Fator de Necrose Tumoral alfa  
TNP-ATP - *Trinitrophenyl-ATP* / Trinitrofenil ATP  
VCAMs - Moléculas de Adesão Celular Vascular

**V. LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Estrutura química dos nucleotídeos de adenina .....	12
Figura 2: Sinalização purinérgica .....	15
Figura 3: Sequência de aminoácidos do receptor P2X7 de humanos.....	19
Figura 4: Representação esquemática da abertura do poro do receptor P2X7 em duas hipóteses .....	22
Figura 5: Presença e interações do receptor P2X7 nas células do SNC .....	25
Figura 6: Histologia em HE de um glioblastoma de camundongo .....	30
Figura 7: Origem dos glioblastomas.....	31
Figura 8: Principais alterações genéticas que ocorrem durante a gliomagenese.....	33
Figura 9: Modelo proposto para o envolvimento do ATP extracelular na progressão tumoral .....	38
Figura 10: Modelo proposto para o envolvimento do receptor P2X7 na progressão tumoral .....	80



**VI. LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Família de Receptores Purinérgicos.....	13
Quadro 2: Moléculas naturais e artificiais que passam pelo poro formado pelo receptor P2X7.. ..	17
Quadro 3: Polimorfismos descritos para o receptor P2X7 de humanos. ....	20
Quadro 4: Antagonistas do receptor P2X7 de humanos na formação de poro.. ..	24
Quadro 5: Expressão e funcionalidade do receptor P2X7 em câncer. ....	28
Quadro 6: Notação Convencional dos Aminoácidos. ....	93

## VII. RESUMO

O nucleotídeo de purina ATP, no meio extracelular, participa de diversos processos fisiológicos e patológicos como vasodilatação/constricção, proliferação, diferenciação, modulação sináptica, dor, inflamação e morte celular. Entre os receptores purinérgicos, o subtipo P2X7 é bem descrito como mediador de processos inflamatórios pela liberação de IL-1 $\beta$  e de morte celular com ativação de caspases. Evidências na literatura apontam para o envolvimento do sistema purinérgico no crescimento e na progressão de glioblastomas. Esses tumores são os mais comuns do SNC e seu alto grau de malignidade deve-se à capacidade de rápida proliferação e invasão no tecido sadio. Considerando a resistência que os glioblastomas apresentam à morte celular induzida por ATP, o objetivo desse trabalho foi investigar a expressão e funcionalidade do receptor citotóxico P2X7 em linhagens de gliomas e suas implicações na biologia tumoral. Entre as linhagens de glioblastomas estudadas, a linhagem de camundongo GL261 apresentou sensibilidade à morte induzida por ATP pela liberação de LDH, incorporação de iodeto de propídio e diminuição da viabilidade mitocondrial. O ATP foi tóxico em concentrações acima de 2 mM, o BzATP foi mais potente que o ATP e o antagonista oATP bloqueou completamente a morte celular. O silenciamento do receptor P2X7, na GL261, por RNA de interferência, também aboliu a morte celular induzida por ATP confirmando o envolvimento desse receptor, embora a formação de poro ainda tenha sido visível nestas células, ainda que diminuída. A morte celular apresentou características necróticas como a ruptura de membrana, a falta de ativação de caspases e a falta de externalização de fosfatidilserina, mas ao mesmo tempo houve encolhimento celular. Além dos efeitos mediados pela sua ativação, o silenciamento do receptor P2X7 na linhagem GL261 diminuiu a adesão e promoveu a migração celular, características de tumores mais invasivos. Em amostras de pacientes com gliomas, foi possível observar que a expressão de P2X7 correlaciona diretamente com a sobrevida dos pacientes. Juntamente com os dados da linhagem silenciada para o P2X7, é possível apontar o receptor P2X7 como uma possível molécula anti-tumoral, cuja redução na expressão diminui a adesão, aumenta a migração, torna a célula resistente à morte induzida por ATP, possivelmente diminuindo, desta forma, a sobrevida de pacientes acometidos por esta doença.

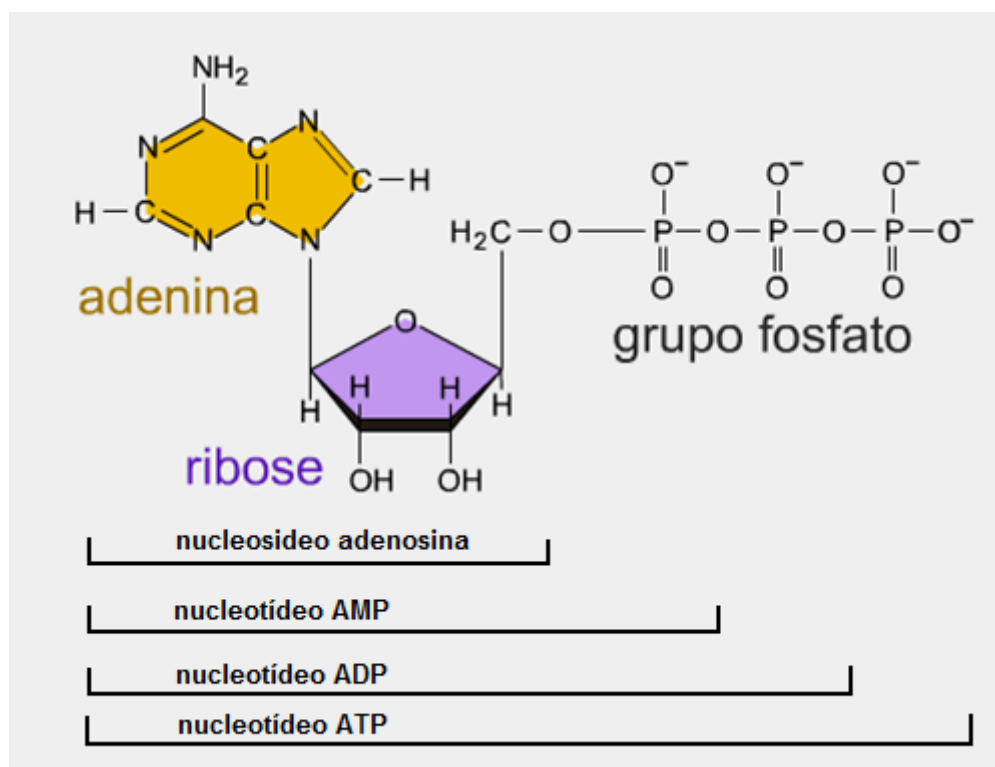
## VIII. ABSTRACT

Purines nucleotides, particularly extracellular ATP, participate in diverse physiological and pathological processes such as vasodilatation/constriction, cell proliferation, differentiation, synaptic modulation, inflammation, pain sensation and cell death. Among purinergic receptors, the P2X7 subtype is well described as a mediator of inflammatory processes via IL-1 $\beta$  release and cellular death induced by caspases activation. Evidences in the literature point to the purinergic system involvement in growth and glioblastoma progression. These tumors are the most common in the central nervous system (CNS) and their high grade of malignance is the result of rapid proliferation and invasion abilities. Considering the resistance that glioblastomas show to ATP-induced cell death, the objective of this work was to investigate the expression and function of cytotoxic P2X7 receptor in glioma cell lines and their implications in tumor biology. Among the glioma cell lines, the mouse GL261 was sensitive to ATP-induced cell death with LDH release, iodide incorporation and a decrease in mitochondrial viability. ATP was toxic in concentrations above 2 mM, BzATP was more potent than ATP and the antagonist oATP blocked completely the cell death induced by ATP. P2X7 receptor silencing in GL261 by RNA interference, also abolished ATP-induced cell death, confirming this receptor involvement, although a diminished pore induction was observed. Cellular death had necrotic features like membrane rupture, lack of caspase activation and lack of phosphatidylserine exposure, but at the same time shrinking also occurs. Beyond its activation effects, P2X7 knockdown in GL261 decreased cell adhesion and promoted migration, features common to more invasive tumors. In human glioma samples, P2X7 receptor expression correlated directly with patients' survival. Together with data from P2X7-knocked down cell line, it is possible to suggest the P2X7 receptor as an anti-tumoral molecule, whose expression reduction leads to decreased adhesion, increased cell mobility, resistance to ATP-induced cell death, and therefore, decreased patients survival.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Introdução ao Sistema Purinérgico

Purinas são compostos orgânicos formados por 2 anéis aromáticos: um anel imidazol e um anel de pirimidina. Entre as purinas mais conhecidas estão a adenina e a guanina. A adição de uma ribose e consequentes grupos fosfatos constitui os nucleosídeos e nucleotídeos de adenina, respectivamente (Figura 1). A importância biológica desses compostos pode ser constatada pelos nichos vitais e universais que ocuparam ao longo da evolução: i) por conterem grupos fosfatos de alta energia, os nucleotídeos tornaram-se os principais estoques de energia dentro da célula; ii) fazem parte da estrutura dos ácidos nucleicos; e iii) mais recentemente, têm sido reconhecidos como moléculas sinalizadoras em diversos tipos celulares.



**Figura 1: Estrutura química dos nucleotídeos de adenina.**

Retirada e adaptada de <http://biogilde.wordpress.com/2009/04/14/>

Embora tenha sido recebida com certo ceticismo, a função de neurotransmissor do ATP foi sugerida no fim dos anos 50 (Holton, 1959), mas somente em 1972, Burnstock propôs o primeiro modelo de sinalização purinérgica (Burnstock, 1972). Este modelo de neurotransmissão não-adrenérgica e não-colinérgica, explicava como o ATP era estocado, liberado, ligava-se em receptores

específicos e ainda tinha sua ação finalizada por enzimas que o hidrolisavam. Ao longo do tempo, receptores e enzimas foram identificados, clonados e caracterizados estabelecendo-se então o sistema purinérgico na sinalização celular não somente de neurônios, mas de diferentes tipos celulares.

Atualmente, sabe-se que a sinalização purinérgica é desencadeada pelos nucleotídeos de adenina (ATP e ADP) que atuam sobre receptores purinérgicos P2, divididos em ionotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y (Quadro 1), e pelo nucleosídeo adenosina que se liga aos receptores P1 ou ainda pode ser recaptado para o interior da célula. Os 7 subtipos de receptores P2X1-7 apresentam-se como homo ou hetero oligômeros (P2X2/3, P2X4/6, P2X1/5, P2X2/6, P2X4/7), e quando ativados permitem a passagem de íons tais como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , despolarizando a membrana plasmática. Já os subtipos de receptores P2Y 1, 2, 4, 6, 11-14 ativam cascatas de sinalização envolvendo fosfolipase C, inositol 3-fosfato e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares ou então afeta a adenilil ciclase, alterando os níveis de AMPc (Burnstock, 2007; Burnstock, 2008; Ralevic & Burnstock, 1998).

Quadro 1: Família de Receptores Purinérgicos.

Receptor Purinérgico	Ligantes Naturais*	Principal Mecanismo de Ação	Principais Funções
<b>P1 A<sub>1</sub></b>	Adenosina	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> ↓cAMP	Neuromodulação prejunctional da liberação de neurotransmissores; sedação, anticonvulsivo, ansiolítico; depressão cardíaca
<b>A<sub>2A</sub></b>	Adenosina	G <sub>s</sub> ↑cAMP	Facilita a neurotransmissão; relaxamento de músculo liso
<b>A<sub>2B</sub></b>	Adenosina	G <sub>s</sub> ↑cAMP	Papel em desordens alérgicas e inflamatórias; vasodilatação
<b>A<sub>3</sub></b>	Adenosina	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> , G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , ↓cAMP, ativação de PLC-β	Facilita a liberação de mediadores alérgicos; cardio e citoprotetor
<b>P2X P2X1</b>	ATP	Canal catiônico ( $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Na}^{2+}$ )	Contração de músculo liso; ativação de plaquetas
<b>P2X2</b>	ATP	Canal iônico (principalmente $\text{Ca}^{2+}$ ) e poro	Transmissão sensorial e modulação da função sináptica
<b>P2X3</b>	ATP	Canal catiônico	Medeia a transmissão sensorial; facilita a liberação de glutamato no SNC
<b>P2X4</b>	ATP >> CTP	Canal iônico (especialmente $\text{Ca}^{2+}$ ) e poro	Modula a inflamação crônica e a dor neuropática

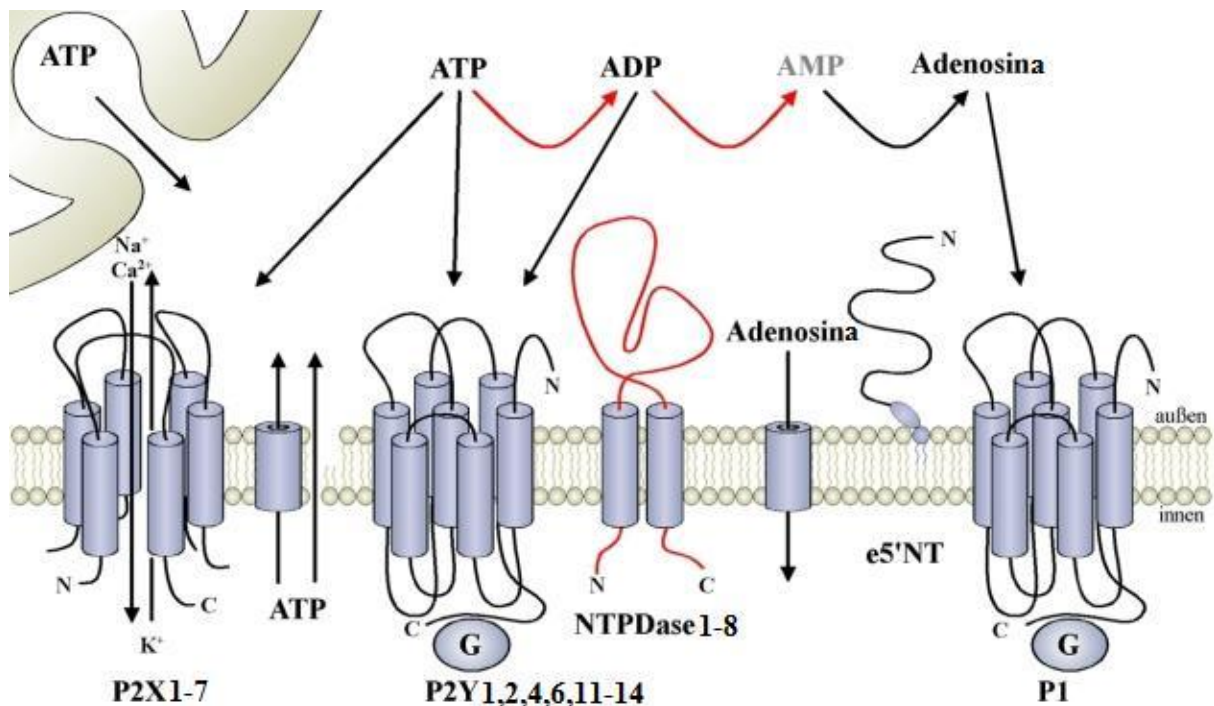
<b>P2X5</b>	ATP	Canal iônico	Inibe a proliferação e aumenta a diferenciação
<b>P2X6</b>	ATP (funciona pobremente como homodímero)	Canal iônico	Funciona como um canal heteromérico com as subunidades de P2X2 e P2X4
<b>P2X7</b>	ATP	Canal catiônico e poro com ativação prolongada	Medeia apoptose; proliferação celular e liberação de citocinas inflamatórias
<b>P2Y P2Y<sub>1</sub></b>	ADP > ATP	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , ativação de PLC-β	Relaxamento de músculo liso e ação mitogênica; agregação e ativação plaquetária; reabsorção óssea
<b>P2Y<sub>2</sub></b>	UTP = ATP	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> e possivelmente G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> , ativação de PLC-β	Vasodilatação no endotélio e vasoconstrição no músculo liso; ações mitogênicas; secreção de surfactante; secreção de Cl <sup>-</sup> nas células endoteliais; remodelamento ósseo
<b>P2Y<sub>4</sub></b>	UTP > ATP	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> e possivelmente G <sub>i</sub> , ativação de PLC-β	Regula o transporte de Cl <sup>-</sup> epitelial; vasodilatação no endotélio; ações mitogênicas
<b>P2Y<sub>6</sub></b>	UDP > UTP >> ATP	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , ativação de PLC-β	Secreção de NaCl no epitélio de cólon; papel na proliferação epitelial
<b>P2Y<sub>11</sub></b>	ATP	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> e G <sub>s</sub> ; ativação de PLC-β	Papel na maturação e migração de células dendríticas; diferenciação granulocítica
<b>P2Y<sub>12</sub></b>	ADP > ATP	Gα <sub>i</sub> , inibição da adenilato ciclase	Agregação plaquetária e papel na secreção de grânulos densos
<b>P2Y<sub>13</sub></b>	ADP >> ATP	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>	Função desconhecida, mas presente em ambos sistemas imune e nervoso
<b>P2Y<sub>14</sub></b>	UDP-glicose ≥ UDP-galactose	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>	Receptor quimioatrativo nas células-tronco hematopoiéticas de medula; ativação de células dendríticas

Abreviaturas: G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>, proteína G inibitória; G<sub>s</sub>, proteína G estimulatória, G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>, proteína G ativadora de PLC- β; PLC- β, fosfolipase C beta. Adaptado de Burnstock 2007 e 2008.

\*Agonistas com maior afinidade ao receptor.

Os efeitos dos nucleotídeos extracelulares podem ser terminados quando são hidrolisados por diferentes membros das famílias das Ecto Nucleosídeo Trifosfohidrolases (E-NTPDases/CD39), Ecto Nucleosídeo Pirofosfatases (E-NPPs)

e Ecto 5'-Nucleotidase 5'-NT/CD73 (Zimmermann, 2001). A adenosina formada pode atuar sobre seus receptores específicos P1, subdivididos em A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> ligados a proteína G. A adenosina também pode ser recaptada por transportadores equilibrativos, ou ainda ser hidrolisada por uma adenosina deaminase em inosina e pela nucleosídeo de purina fosforilase em hipoxantina, finalizando assim a sinalização purinérgica (Fredholm, 2007). O fino controle das concentrações de nucleotídeos extracelulares realizado por essas enzimas é extremamente importante porque determina os subtipos de receptores purinérgico estimulados em cada célula (Figura 2).



### Figura 2: Sinalização purinérgica.

O ATP liberado exerce seus efeitos ligando-se aos receptores P2X e P2Y, sendo hidrolisado por NTPDases em ADP, que liga-se em receptores P2Y. O ADP também é hidrolisado por NTPDases em AMP, cujo último fosfato é retirado pela ecto-5'-nucleotidase (e5'NT). A adenosina formada ativa os receptores P1 e pode ser captada por transportadores próprios. Figura retirada e adaptada do site: <http://www.uni-leipzig.de/~straeter/research/ntpdase.html> de autoria do Prof. Dr. Norbert Sträter.

Esta sinalização pode ser encontrada em praticamente todos os sistemas fisiológicos: cardíaco, sanguíneo, imunológico, digestório, endócrino, nervoso central e periférico, pulmonar, renal de humanos e murinos desempenhando as mais diferentes funções. Com ampla participação dessa via de sinalização nos diferentes processos fisiológicos é fácil perceber que qualquer descontrole, por menor que

seja, em qualquer uma das etapas de sinalização leva a condições patológicas também diversas. Exatamente por isso, agonistas e antagonistas purinérgicos têm servido como molde para o desenvolvimento de fármacos empregados no tratamento de diferentes doenças.

## 1.2 Histórico do receptor P2Z / P2X7

Entre os receptores P2X, o subtipo P2X7 foi o primeiro a ser descrito como um receptor que, além de abrir canais catiônicos na célula, é capaz de dilatar poros na membrana plasmática frente a altas concentrações de agonista ou exposição prolongada, o que torna a célula permeável a moléculas de peso molecular até 900 Da. As primeiras evidências de células permeabilizadas por indução de ATP extracelular foram feitas em células 3T3 transformadas, em 1975, por Rozengurt e Heppel (Rozengurt & Heppel, 1975). Quando, em 1979, Cockcroft e Gomperts (Cockcroft & Gomperts, 1979) demonstraram este mesmo efeito em mastócitos de ratos, inaugurou-se uma grande linha investigativa sobre o processo de permeabilização celular estimulada por ATP.

Este processo foi caracterizado farmacológica e bioquimicamente por diversos grupos como Silverstein (Steinberg et al., 1987), Weisman (Weisman et al., 1984) e Wiley (Wiley, Chen & Jamieson, 1993), os quais descreveram essa rápida entrada de compostos de peso molecular relativamente alto (Quadro 2) por meio da abertura de um poro não-seletivo através do “receptor de ATP”, mais tarde denominado P2Z como continuação do alfabeto romano. (Gordon, 1986). Enquanto os demais receptores P2 eram ativados por concentrações em torno de 1-10  $\mu\text{M}$  de ATP ou ADP, o receptor P2Z necessitava de concentrações maiores de 100  $\mu\text{M}$  de ATP, principalmente na forma ácida completamente ionizada  $\text{ATP}^{4-}$  e não na forma complexada com  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  (Cockcroft & Gomperts, 1980). Por isso, a alcalinização do meio ou a remoção de  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  aumentam a afinidade do ATP ou do benzoil-ATP (BzATP, seu principal agonista) ao receptor (Rassendren et al., 1997), provavelmente por disponibilizar mais a forma  $\text{ATP}^{4-}$ . Íons divalentes de metais tais como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  também inibem as correntes desencadeadas pelo P2X7 (Virginio et al., 1997; Watano, Matsuoka & Kimura, 2002). As primeiras funções fisiológicas descritas para o receptor P2Z incluíram mediação da liberação de grânulos de histamina em mastócitos de rato (Cockcroft & Gomperts, 1979), liberação de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) em monócitos e macrófagos ativados (Perregaux



& Gabel, 1998; Solini et al., 2008), demonstrando seus importantes efeitos no sistema imune. A fama de receptor citotóxico foi confirmada com as descobertas de indução de morte celular por ligação de ATP (Di Virgilio, 1995).

Quadro 2: Moléculas naturais e artificiais que passam pelo poro formado pelo receptor P2X7. Montado a partir de Adinolfi et al. (2005).

Molécula	Peso Molecular em Da
Colina	100
Metilglucamina	190
Brometo de etídio	314
YOPRO-1	376
Iodeto de propídeo	414
Lucifer yellow	457

### 1.3 Estrutura do receptor P2X7

Em 1996, Surprenant e colaboradores (Surprenant et al., 1996) isolaram o cDNA do receptor P2Z do gânglio de ratos identificando-o como P2X7. A proteína codificada, nos seus primeiros 395 aminoácidos tinha 35-40% de identidade com os demais membros da família dos receptores P2X e apresentava características farmacológicas similares às do antigo P2Z. Ainda nesse estudo, correntes elétricas desencadeadas pela indução de ATP e BzATP demonstraram que o receptor P2X7 apresentava duas respostas distintas. A primeira era induzida por correntes transitórias através de canais permeáveis a pequenos cátions pela breve exposição ao agonista, parecida com as respostas de outros P2Xs e na segunda resposta, estabelecia-se uma corrente estável que levava à dilatação de um poro não seletivo por repetidas aplicações de agonistas. A clonagem dessa proteína em sistemas heterólogos permitiu, nos anos seguintes, estudo extenso sobre a estrutura e funcionalidade do receptor P2X7 (Rassendren et al., 1997).

Assim, os 595 aminoácidos (Figura 3), no total, codificam uma proteína cuja estrutura predita compreende dois domínios transmembrana; uma região extracelular rica em cisteínas, com resíduos de lisina e glicina conservados e vários potenciais sítios de glicosilação, seguido por um longo trecho (da fenilalanina 188

até a valina 321) que provavelmente formam 6 folhas  $\beta$  pregueadas antiparalelas; e finalmente, extremidades N- e C- terminal intracelulares (Ennion & Evans, 2002; Jiang et al., 2000; Newbolt et al., 1998). O sítio de ligação ao ATP parece residir nessa região de folhas  $\beta$  pregueadas, uma vez que substituições de aminoácidos nas lisinas 193 e 311 inibem completamente a captação de brometo de etídio e bário (Worthington et al., 2002). Similaridades estruturais entre os domínios de ligação ao ATP dos receptores P2X e da classe II das aminoacil-tRNA sintetases foram descritas (Freist et al., 1998). Aliás, estudos bioquímicos sugeriram a existência de múltiplos sítios de ligação ao ATP, a partir dos coeficientes de Hill derivados das curvas de dose de ATP (Klapperstuck et al., 2001). Juntamente com experimentos que revelaram não haver mudanças na densidade de receptores P2X7 quando há a formação do poro (Smart et al., 2002), essas evidências apontam que provavelmente a ativação da permeabilização celular ativada por ATP dependa mais da mudança conformacional do receptor do que do recrutamento de várias subunidades da proteína.

Dentre os membros da família dos receptores P2X, o subtipo P2X7 apresenta a extremidade C-terminal mais longa, que é essencial para a habilidade de abertura de poro na membrana plasmática (Rassendren et al., 1997; Surprenant et al., 1996). Inicialmente, achava-se que somente o P2X7 apresentava essa característica de formação de poro, entretanto, desde 1999, sabe-se que também os receptores P2X2, P2X3 e P2X4 podem dilatar poros que permitem a passagem de moléculas como glucamina e até YO-PRO-1, de maneira progressiva e sob exposição prolongada de agonistas (Virginio et al., 1999; Khakh et al., 1999; Eickhorst et al., 2002; Fujiwara & Kubo, 2004). Diferentemente do P2X7, a dilatação do poro feita pelos receptores P2X2 e P2X4 são reversíveis e não causam lise celular (Virginio et al., 1999).

Estudos na literatura demonstram que tanto mutações alélicas quanto a existência de polimorfismos na extremidade C-terminal do P2X7 ocasionam a perda de função de poro do receptor. Por exemplo, uma mutação em que há troca da prolina 451 por leucina na porção C-terminal do receptor P2X7, naturalmente encontrada em certas linhagens de camundongos, reduz a capacidade de formação de poro induzida por ATP (Adriouch et al., 2002; Le Stunff et al., 2004). Aliás, tem-se sugerido, através da análise de experimentos com proteínas truncadas, que esta extremidade precisa estar quase que intacta (95%) para a formação de poro. Proteínas truncadas no resíduo 581 apresentaram entrada de brometo de etídio

negligenciável, enquanto que células expressando o mesmo P2X7 truncado no resíduo 582 voltaram a permitir a entrada de molécula fluorescente no mesmo nível da proteína selvagem (Smart et al., 2003). Já a atividade de canal iônico não é afetada, nem mesmo em receptores truncados no resíduo 380. Ainda no mesmo estudo, deleções entre os resíduos 551 e 581 resultaram em receptores não funcionais sem detecção da sua expressão na superfície celular, sugerindo que esta região está envolvida na localização membranar do receptor P2X7 (Smart et al., 2003).

O gene do receptor P2X7 é altamente polimórfico e a maioria das substituições confere perda de função da proteína (Fuller et al., 2009). Os polimorfismos descritos para esse receptor com os respectivos resultados podem ser encontrados no Quadro 3 abaixo. Além disso, o transcrito de P2X7 humano pode sofrer processamento alternativo gerando até 7 variantes diferentes, inclusive uma em que falta quase toda a extremidade do receptor (Cheewatrakoolpong et al., 2005). Esta variante é altamente expressa em vários tecidos, demonstrando que nesses locais houve a seleção de um P2X7 com a função restrita de canal iônico. Ao contrário, a oitava variante descrita para o receptor P2X7 apresenta ganho de função em ambas as funções de canal iônico e de formação de poro (Nicke et al., 2009).

10	20	30	40	50	60
MPACCS	CS	SDV	FOYET	IN	KVTR
IQSM	NYGT	IK	WFFH	VII	IFS
VCF	ALV	SD	KL	YQ	RP
70	80	90	100	110	120
VHTK	VKG	IAE	VKEE	I	VENG
KKL	VH	S	V	F	DT
AD	Y	T	F	P	L
S	F	F	V	M	T
N	F	L	K	TE	G
130	140	150	* 160	170	180
EYPT	RR	TL	CS	SD	RG
C	K	K	G	W	M
D	P	Q	S	K	I
T	G	T	G	R	C
190	200	210	220	230	240
LLNS	AE	N	F	T	V
L	I	K	N	I	D
F	P	G	H	N	T
T	R	N	I	L	P
GL	N	I	T	C	T
F	H	K	T	Q	N
P	I	F	R	L	G
250	260	270	280	290	300
NFSD	V	A	I	Q	G
I	M	G	I	E	I
W	D	C	N	L	D
R	F	H	H	C	R
P	K	Y	S	F	R
L	D	D	K	T	T
N	V	S	L	Y	P
310	320	330	340	350	360
* 310	320	330	340	350	360
ENNV	E	K	R	T	L
K	V	F	G	I	R
F	D	I	L	V	F
G	T	G	K	F	D
I	Q	L	V	V	I
G	S	T	L	S	F
G	L	A	A	V	F
I	D	F	L	I	D
370	380	390	400	410	420
NCCR	S	H	I	Y	P
C	K	C	Q	P	C
V	V	N	E	Y	Y
R	K	K	C	E	S
I	V	E	P	K	P
T	L	K	Y	V	S
F	V	D	E	S	H
I	R	M	V	N	Q
430	440	450	460	470	480
LQDV	K	G	Q	E	V
R	P	A	M	D	F
T	D	L	S	R	L
P	L	P	L	A	L
H	D	T	P	P	I
P	I	P	G	Q	E
E	I	Q	L	L	R
K	E	A	T	P	R
490	* 500	510	520	530	540
SCLP	S	Q	L	P	E
H	R	C	L	E	E
L	C	C	K	P	G
A	C	T	T	S	E
E	L	F	R	K	L
V	L	S	R	H	V
L	L	L	L	L	Y
Q	E	P	L	L	A
550	560	*570	580	590	
TNSR	L	R	H	C	A
R	C	Y	A	T	W
R	F	G	S	Q	M
A	F	A	I	L	P
S	C	R	W	R	I
R	K	E	F	P	K
S	G	Y	S	G	F
K	S	P	Y		

**Figura 3: Sequência de aminoácidos do receptor P2X7 de humanos.**

Regiões em rosa representam as extremidades intracelulares; em amarelo, as regiões transmembrana; em azul, o domínio extracelular. Os potenciais sítios de

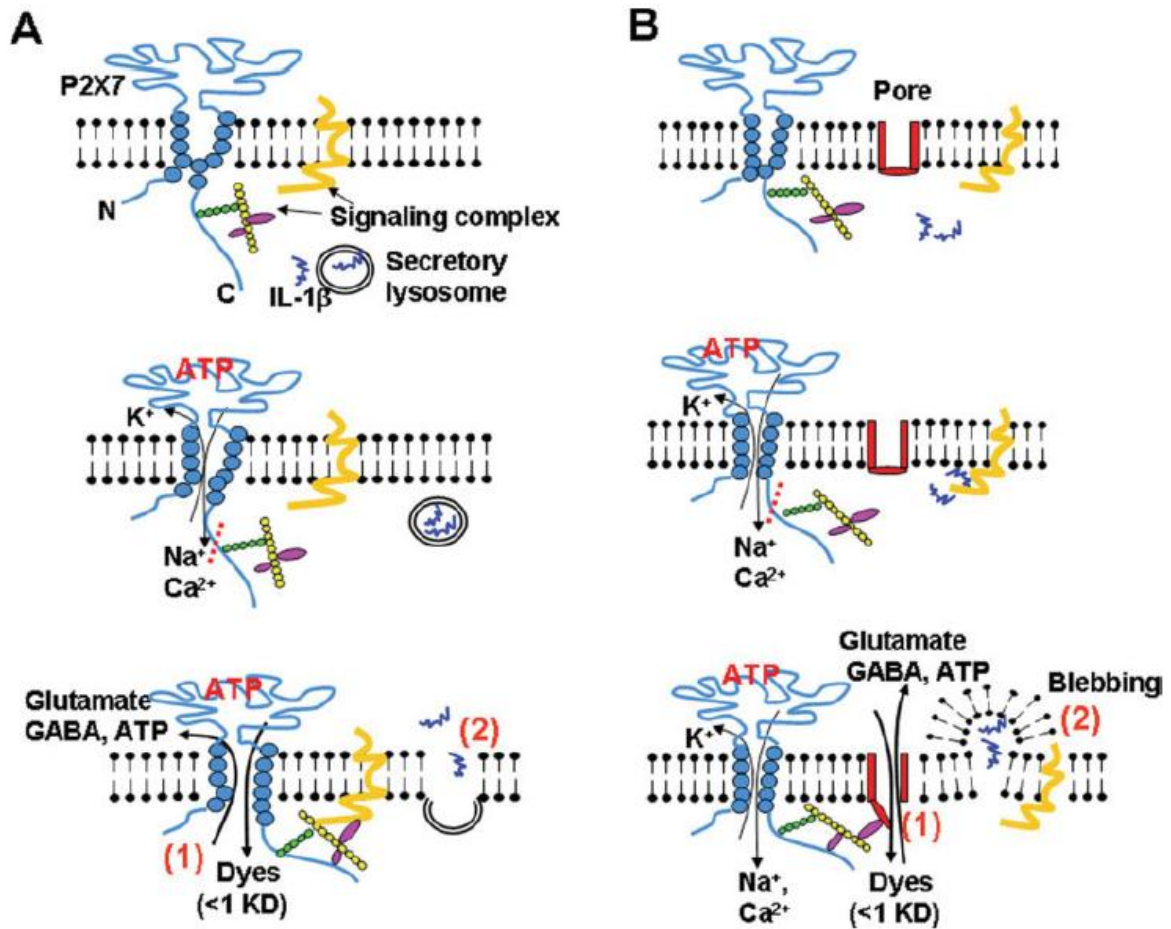
glicosilação estão destacados em negrito e o sítio de fosforilação está sublinhado. Os polimorfismos descritos para esse receptor estão marcados com um \*. Figura montada a partir das referências: (Ennion & Evans, 2002; Boué-Grabot et al., 2000; Jiang et al., 2000; Newbolt et al., 1998) e das listadas no Quadro 3. A notação convencional dos aminoácidos pode ser acompanhada no Quadro 6 da seção Apêndice.

Quadro 3: Polimorfismos descritos para o receptor P2X7 de humanos.

Polimorfismo	Resultado	Susceptibilidade a Doenças	Referência Bibliográfica
<b>H155Y</b> ou <b>489C&gt;T</b>	Ganho de função		(Cabrini et al., 2005)
<b>R307Q</b>	Limita grandemente o fluxo de íons Rb <sup>+</sup> , Ba <sup>2+</sup> e brometo de etídio		(Gu et al., 2004)
<b>Q460R</b>	Diminuição de função	Transtorno depressivo maior	(Cabrini et al., 2005; Lucae et al., 2006)
<b>E496A</b> ou <b>1513A&gt;C</b>	Perda de função	Fator de risco para tuberculose nas populações mexicana e asiática e risco aumentado de fraturas em mulheres na pós-menopausa	(Fernando et al., 2007; Gu et al., 2001; Nino-Moreno et al., 2007; Ohlendorff et al., 2007)
<b>I568N</b> ou <b>1729T&gt;A</b>	Perda de função, interferência na localização da proteína na membrana	Risco aumentado de fraturas em mulheres na pós-menopausa	(Ohlendorff et al., 2007; Wiley et al., 2003)

Por fim, tem sido proposto um domínio de ligação à molécula de lipopolissacarídeo (LPS) na porção C-terminal, o que explicaria as respostas inflamatórias desencadeadas pelo P2X7, após a adição de LPS (Denlinger et al., 2001). Em macrófagos estimulados com LPS, este receptor modula a secreção de diversas moléculas imunomoduladoras tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e óxido nítrico. Interessantemente, peptídeos derivados de P2X7 também são capazes de se ligarem ao LPS, bloqueando seus efeitos celulares como, por exemplo, a ativação das quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) 1 e 2 e a estimulação da degradação de I $\kappa$ B- $\alpha$ . Este motivo de interação lipídica também desempenha papel no controle do tráfego do receptor para a membrana e na modulação do canal iônico (Denlinger et al., 2003). Além dos motivos de interação proteína-lipídio, outros motivos de interação proteína-proteína foram encontrados na sequência peptídica da extremidade do P2X7. De fato, já foi descrito que o receptor P2X7 participa de um

complexo protéico multimérico (Figura 4), no qual interage com até 11 proteínas, que podem ser imunoprecipitadas com ele: proteínas de matriz extracelular como a laminina  $\alpha 3$ ; proteínas que atravessam a membrana como a integrina  $\beta 2$  e o receptor da proteína tirosinofosfatase-beta (RPTP $\beta$ ); proteínas de citoesqueleto como a  $\beta$ -actina, a  $\alpha$ -actinina, supervilina e outras de funções diversas: guanilato quinase P55 associada a membrana (MAGuK), proteínas de choque térmico (Hsp) 70 e 90, proteína cognato de choque térmico 71 (Hsc71) e fosfatidilinositol-4-quinase (PI4K) (Kim et al., 2001). Já o ensaio de duplo híbrido realizado em leveduras, apontou a interação da extremidade C-terminal do P2X7 com vários membros da família de proteínas de membrana epitelial (EMPs), que têm suas funções ligadas à mediação de apoptose (Wilson et al., 2002). Recentemente, descobriu-se que além dos eventos de sinalização que ocorrem a jusante da ligação de ATP, a formação do poro requer o recrutamento de proteínas formadoras de hemicanais, chamadas panexinas, para a membrana plasmática (Pelegriin & Surprenant, 2006). Assim, o questionamento quanto à natureza do poro formado pelo P2X7, se ele é a dilatação do canal iônico ou uma proteína diferente ativada pelo P2X7, parece estar próximo de ser resolvido (Figura 4).



**Figura 4: Representação esquemática da abertura do poro do receptor P2X7 em duas hipóteses:**

A) Hipótese da dilatação direta do canal iônico. Painel superior: pela topologia do receptor, na extremidade C-terminal está associado um complexo de sinalização que consiste em proteínas do citoesqueleto, fosfatases e quinases, proteínas intracelulares e de membrana, importantes para o rearranjo do citoesqueleto e dobramento de proteínas. Painel intermediário: no estágio inicial da ativação do P2X7 ou em proteínas truncadas (linha vermelha pontilhada), o receptor funciona como um canal iônico. Painel inferior: ativação prolongada do P2X7 resulta na ativação de segundos mensageiros, no rearranjo do complexo de sinalização, induzindo (1) à dilatação de um poro e (2) secreção de IL-1β. B) Hipótese do poro separado. Painéis superior e intermediário, similar ao que ocorre em A, com a diferença da existência de um poro separado. Painel inferior: a ativação do complexo de sinalização leva (1) à abertura de um poro não-seletivo independente e (2) à liberação de IL-1β. Adaptado de Duan e Neary, 2006.

#### 1.4 Farmacologia do Receptor P2X7

O principal ativador endógeno do receptor P2X7 é o ATP, em concentrações muito maiores ( $EC_{50} \geq 100 \mu M$ ) em comparação com outros P2Xs. Entretanto, a

molécula de ATP rígido 2,3-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP, o BzATP, foi inicialmente descrito como sendo aproximadamente 30 vezes mais potente que o ATP (Bianchi et al., 1999; Surprenant et al., 1996). Estudos farmacológicos recentes, que comparam a eficácia do BzATP no P2X7 de humano, rato e camundongo BALB/c e C57BL/6 (Donnelly-Roberts et al., 2009), confirmaram que na atividade de canal iônico, o BzATP foi 10 vezes mais potente como ativador do receptor de humanos e ratos do que o de camundongos. Na comparação entre as potências dos agonistas, o BzATP foi 10-12 vezes mais potente do que o ATP no P2X7 de humanos e camundongos, demonstrando ainda que o ATP é um fraco ligante do receptor de rato, como reportado anteriormente (Chen et al., 2005). 2MeSATP (2-metiltiltioATP) e ATP $\gamma$ S (adenosina-5'-O-(3-tiotrifosfato) são capazes de ativar o P2X7 humano, mas não tiveram atividade de agonista nos receptores de roedores. A exposição ao agonista rapidamente leva à abertura do canal catiônico e se a presença do ligante estende-se por mais tempo, ocorre a transição progressiva para a condição de poro não-seletivo. De fato, na captação de Yo-Pro-1, o BzATP também foi o agonista mais potente e promoveu a formação de poro em P2X7 humano 10 vezes mais eficientemente do que em rato e 100 vezes mais do que em camundongo, demonstrando a alta sensibilidade do receptor P2X7 humano em relação ao de roedores tanto na função de canal iônico como na de poro. O ATP mostrou uma fraca ou nenhuma atividade nos P2X7 de rato e camundongo na captação de Yo-Pro (Donnelly-Roberts et al., 2009).

Embora alguns reagentes, como suramin, PPADS e *reactive blue* tenham demonstrado um efeito antagonista no receptor P2X7, nenhum deles mostrou-se específico para o receptor P2X7. O primeiro antagonista seletivo descrito para este receptor, foi o ATP oxidado (oATP), que irreversivelmente bloqueia os sítios de ligação ao ATP, provavelmente por ligação covalente (Murgia et al., 1993). Por muitos anos, o oATP foi utilizado nos experimentos de identificação farmacológica do P2X7, mas outras moléculas foram sendo adicionadas à lista de antagonistas do receptor. No estudo comparativo do receptor P2X7 de camundongos, rato e humano (Donnelly-Roberts et al., 2009), apresentaram atividade de antagonista do receptor P2X7, tanto na propriedade de canal como na de poro, os compostos listados no Quadro 4. Neste estudo, os dois únicos antagonistas que funcionaram em receptores P2X7 de todas as espécies e que se comportaram de modo seletivo foram os recentemente descobertos A-740003 e A-438079. Os demais reagentes

falharam na especificidade, antagonizando outros receptores P2X ou foram espécie-específicos.

Quadro 4: Antagonistas do receptor P2X7 de humanos na formação de poro.

<b>Antagonista</b>	<b>pIC<sub>50</sub>*</b>
Piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato ( <b>PPADS</b> )	5,9
1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazine ( <b>KN62</b> )	6,7
<i>Brilliant Blue G</i> ( <b>BBG</b> )	5,1
Piridoxal-5'-phosphate-6-(2'-naftilazo-6'-nitro-4',8'-disulfonato ( <b>PPNDS</b> )	6,7
Ácido 4-[(4-formil-5-hidroxi-6-metil-3-[(fosfonooxi)metil]-2-piridinil)azo]-benzoico ( <b>MRS 2159</b> )	6,5
N-(1-[[[(cianoimino)(5-quinolinilamino) metil] amino]-2,2-dimetilpropil]-2-(3,4-dimetoxifenil)acetamida) ( <b>A-740003</b> )	7,0
3-[[5-(2,3-diclorofenil)-1H-tetrazol-1-il]metil]piridine hidrocloreto ( <b>A-438079</b> )	6,0

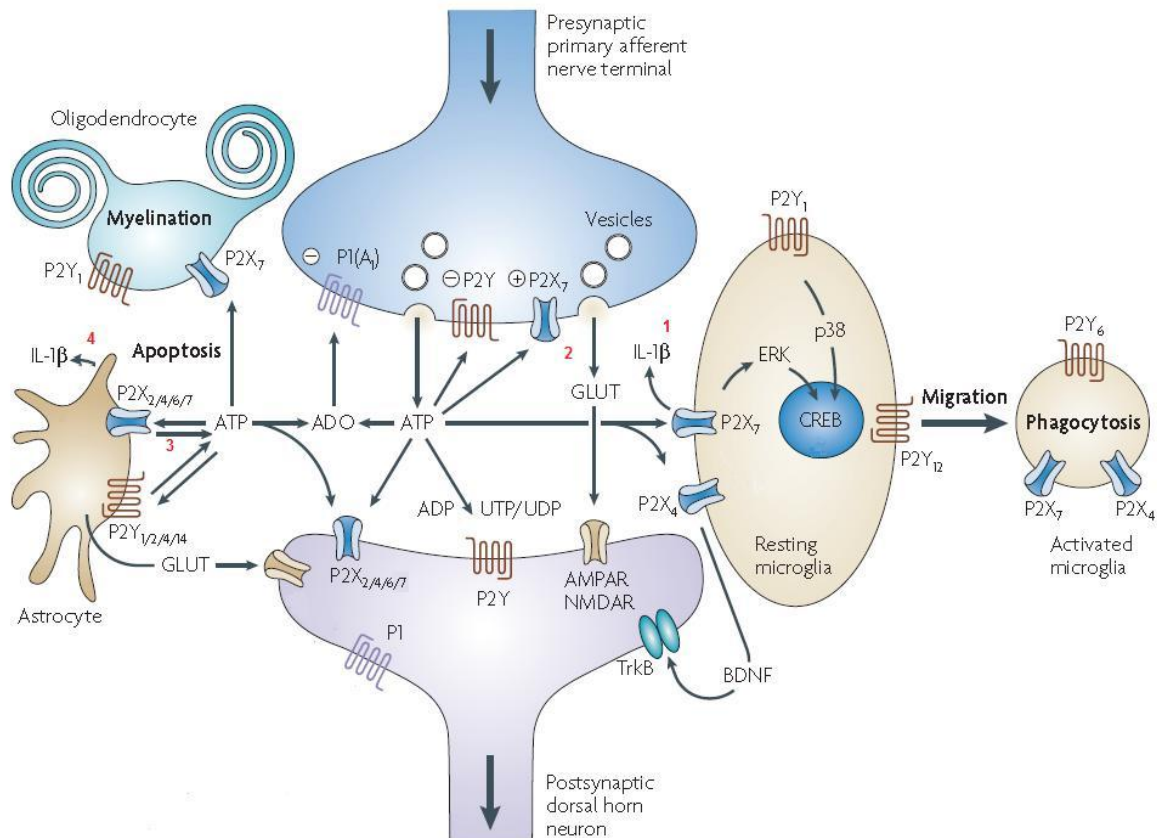
\* pIC<sub>50</sub> significa  $-\log(\text{IC}_{50})$ , ou seja pIC<sub>50</sub> = 4 representa um pIC<sub>50</sub> de 10<sup>-4</sup>M.

Adaptada de Donnelly-Roberts et al., 2009.

### 1.5 Expressão no SNC e funções

No sistema nervoso central (SNC), o receptor P2X7 está distribuído amplamente em quase todos os tipos celulares (Wei et al., 2008), desempenhando as mais diferentes funções. Inicialmente, o receptor P2Z foi identificado em células da microglia (Ferrari et al., 1996) e astrócitos (Ballerini et al., 1996). Após seu reconhecimento como P2X7, sua expressão foi confirmada na microglia (Di Virgilio et al., 1999; Solini et al., 2008), em astrócitos (Kukley et al., 2001; Panenka et al., 2001), neurônios (Brandle, Kohler & Wheeler-Schilling, 1998; Deuchars et al., 2001), células de Muller na retina (Pannicke et al., 2000) e células de Schwann (Colomar & Amedee, 2001). Na Figura 5, estão representadas algumas das interações do receptor purinérgico P2X7 com outros receptores nas diferentes células do SNC.





### Figura 5: Presença e interações do receptor P2X7 nas células do SNC.

Os comentários seguem-se nos próximos parágrafos. Siglas: GLUT, glutamato; AMPAR/NMDAR, receptores de glutamato; IL-1 $\beta$ , interleucina 1 beta; CREB, proteína ligadora ao elemento responsivo a cAMP; BDNF, fator neurotrófico derivado de cérebro; TrkB, receptor neurotrófico tirosina quinase; ERK, quinase regulada por sinal extracelular. Adaptado de Burnstock, 2008.

Na microglia (Figura 5, número 1), o receptor P2X7 pode levar à liberação de IL-1 $\beta$  (Solini et al., 2008), de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ) (Hide et al., 2000) e do fator de transcrição NF-kappaB (Solini et al., 2008). Sabendo-se que todas essas moléculas são efetoras de situações inflamatórias adversas, fica fácil compreender que o descontrole da ativação do receptor pode facilitar, através delas, o estabelecimento de condições neurodegenerativas como processos de morte celular, principalmente, por apoptose (Solini et al., 2008). Mais recentemente, Takenouchi e colaboradores (Takenouchi et al., 2009) descreveram um novo mecanismo de morte celular, em células de microglia, pelo qual a ativação do P2X7 impede a sinalização autofágica, ao mesmo tempo em que estimula a liberação de autofagolisossomos/fagolisossomos no espaço extracelular.

Localizado nos terminais pré-sinápticos de neurônios da medula oblongata e da medula espinhal (Deuchars et al., 2001), o receptor P2X7 parece desempenhar

papéis importantes na modulação sináptica. Aplicações de BzATP causaram despolarização em fatias de medula espinhal, o que foi bloqueado tanto por inibidores de P2X7 quanto de receptores glutamatérgicos, demonstrando que a ativação de P2X7 induz a liberação de glutamato (Figura 5, número 2) (Deuchars et al., 2001). Embora não se saiba se a origem desse neurotransmissor é de terminais pré-sinápticos ou de células gliais, este mesmo estudo demonstrou que existe uma via de liberação de vesículas do terminal pré-sináptico ativa, constatada pela liberação de corante fluorescente induzido por BzATP e inibido por oATP e BBG, reforçando essa alternativa. Também na junção neuromuscular, a expressão de P2X7 foi identificada. Em neurônios do hipocampo de rato, Sperlagh e colaboradores (Sperlagh et al., 2002) descreveram também uma liberação de GABA e glutamato a partir da ativação de receptores P2X7 pré-sinápticos, cuja presença foi determinada por hibridização *in situ* de mRNA. Por outro lado, a transmissão sináptica em fibras musgosas da região CA3 é inibida pela ativação de P2X7 (Panenka et al., 2001). De qualquer maneira, exposições prolongadas ao ATP extracelular são prejudiciais aos neurônios, já que culturas organotípicas e culturas primárias de neurônios cerebelares são extremamente sensíveis à morte com concentrações maiores que 0,5 mM de ATP (Amadio et al., 2002; Morrone et al., 2005).

Já os astrócitos, células que mantêm a homeostase cerebral e o ambiente favorável às transmissões sinápticas, inclusive participando delas, possivelmente desenvolveram mecanismos de proteção ao ATP. Aliás, a ativação do receptor P2X7 parece ser um sinal de alerta de situações de trauma ou injúria. A liberação de neurotransmissores como ATP (Figura 5, número 3) (Ballerini et al., 1996; Suadicani, Brosnan & Scemes, 2006) e glutamato (Duan et al., 2003) também tem sido reportada ser induzida pela ativação do receptor P2X7 nos astrócitos. Ambos neurotransmissores parecem ser liberados através da abertura do poro formado pelo complexo P2X7 e panexina, uma vez que inibidores de *gap junction*, que inibem também a panexina, bloqueiam a liberação de ATP induzida por ATP (Suadicani et al., 2006). O efluxo de glutamato através do poro é uma das vias mais consideradas para esse neurotransmissor, já que outras vias como transportadores de glutamato, excitação dependente de  $Ca^{2+}$  e até lise de membrana foram excluídas (Duan et al., 2003). Diversas outras respostas estão descritas para esse receptor em astrócitos: inibição da liberação de TNF $\alpha$  induzida por LPS (Kucher & Neary, 2005); indução de parada de crescimento sem afetar a viabilidade celular (Neary, Kang & Shi, 2005);

indução da superexpressão da quimiocina MCP-1, responsável em parte pela infiltração de leucócitos durante um trauma ou inflamação (Panenka et al., 2001), liberação de IL-1 $\beta$  (Figura 5, número 4) e ativação da via de pró-sobrevivência da Akt (Morrone et al., 2003). Tem sido proposto, inclusive, que células da microglia ativadas liberem vesículas contendo o receptor P2X7 que, por sua vez, quando ativado pelo ATP liberado de astrócitos próximos resulte em lise vesicular e liberação das citocinas do seu interior, estabelecendo um importante *cross-talk* entre as células do SNC (Bianco et al., 2005). Em conjunto, estes trabalhos parecem reforçar a ideia de que o receptor P2X7 pode ser um sensor de injúria e desencadeie respostas de socorro celular.

## 1.6 Expressão em Câncer

Assim como nos processos fisiológicos, o receptor P2X7 não desempenha apenas uma função, mas, ao contrário, está envolvido em mecanismos celulares até mesmo antagônicos como morte e sobrevivência celular. Também a expressão desse receptor em neoplasias não obedece nenhum padrão identificável. De fato, na maioria dos cânceres, o receptor P2X7 está super-expresso como em câncer de próstata, de mama, de tireóide e de pâncreas (Quadro 5), ou ainda sua expressão está relacionada diretamente com a agressividade tumoral como na leucemia linfocitária crônica. Em carcinomas de pele, sua distribuição pode ajudar a diferenciar lesões benignas de tumores malignos. Por outro lado, em amostras de câncer epitelial uterino, a expressão de P2X7 está extremamente diminuída, de tal maneira que os autores sugerem que essa diminuição possa ser utilizada no diagnóstico da doença. Em estudos que relatam somente a presença e função do receptor P2X7, as respostas desencadeadas por esse receptor também não são unificadas. Se em células de melanoma e carcinoma epitelial de intestino, a ativação de P2X7 leva à morte celular, em neuroblastomas e gliomas de rato C6 o mesmo receptor induz proliferação (Raffaghello et al., 2006) e migração celular (Wei et al., 2008). De fato, o receptor P2X7 parece estar envolvido na biologia tumoral e sua expressão e funcionalidade merecem ser investigadas em gliomas, como potencial alvo terapêutico.

Quadro 5: Expressão e funcionalidade do receptor P2X7 em câncer.

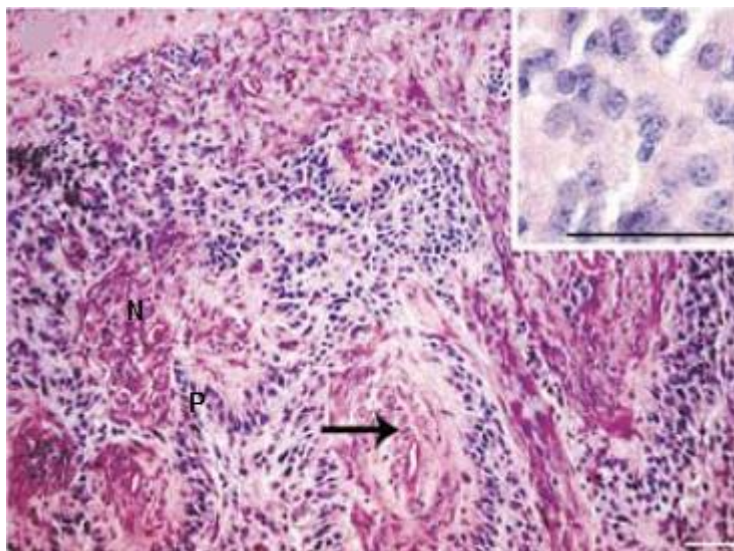
<b>Tipo de Câncer</b>	<b>Estado da expressão de P2X7*</b>	<b>Nível de expressão</b>	<b>Efeito Fisiológico da ativação</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
Próstata	Superexpresso	proteína	ND	(Slater et al., 2004a)
Mama	Superexpresso	proteína	Não funcional	(Slater et al., 2004b)
Tireóide	Superexpresso	mRNA e proteína	ND	(Solini et al., 2008)
Pâncreas	Superexpresso	mRNA	ND	(Kunzli et al., 2007)
Carcinoma de Pele	Superexpresso	proteína	ND	(Slater & Barden, 2005)
Epitelial Uterino	Reprimido	mRNA e proteína	ND	(Li et al., 2006)
Glioma	Expressão induzível por BzATP	mRNA e proteína	Induz Migração	(Wei et al., 2008)
Neuroblastoma	Presente	proteína	Induz Proliferação	(Raffaghello et al., 2006)
Melanoma	Presente	mRNA e proteína	Induz Morte Celular	(White, Butler & Burnstock, 2005)
Epitelial Intestino	Presente	proteína	Induz Morte Celular	(Coutinho-Silva et al., 2005)
Leucemia Linfocítica Crônica	Superexpresso na variante mais severa da doença	mRNA e proteína	Diminui proliferação	(Adinolfi et al., 2002)

\*Em relação ao tecido sadio correspondente

ND: não determinado

### **1.7 Gliomas: Descrição e incidência**

Gliomas são tumores primários que surgem no sistema nervoso central e que compartilham várias semelhanças nas características morfológicas e na expressão de proteínas com as células gliais, tais como astrócitos, oligodendrócitos e seus precursores (Holland, 2001). Segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (Louis et al., 2007), existem 4 graus de tumores astrocíticos dispostos a seguir. Astrocitomas de grau I são lesões com baixo potencial proliferativo, com possibilidade de cura após remoção cirúrgica, têm como exemplos astrocitoma pilocítico e astrocitoma subependimal de células gigantes. Astrocitomas de grau II geralmente apresentam natureza infiltrativa e apesar do baixo índice de proliferação, frequentemente reincidem ou ainda progridem para graus maiores; estão incluídos: astrocitoma pilomixóide, astrocitoma difuso e xantastrocitoma pleomórfico. São classificadas como grau III as lesões com evidências histológicas de malignidade, o que inclui núcleo atípico e atividade mitótica ativa; o tratamento para esses pacientes inclui quimio e radio terapias como adjuvantes. São exemplos desse tipo de tumor astrocitomas anaplásicos. Os tumores de maior malignidade são designados como grau IV, apresentam características citologicamente malignas (pleomorfismo celular e nuclear), mitose intensa, proliferação microvascular, tendência para áreas de necrose, comumente em pseudopaliçada, uma rápida evolução da doença pré- e pós-cirurgia, e são na maioria das vezes fatais (Figura 6). Fazem parte dessa classe de tumores os glioblastomas, glioblastomas de células gigantes e gliossarcomas (Louis et al., 2007).



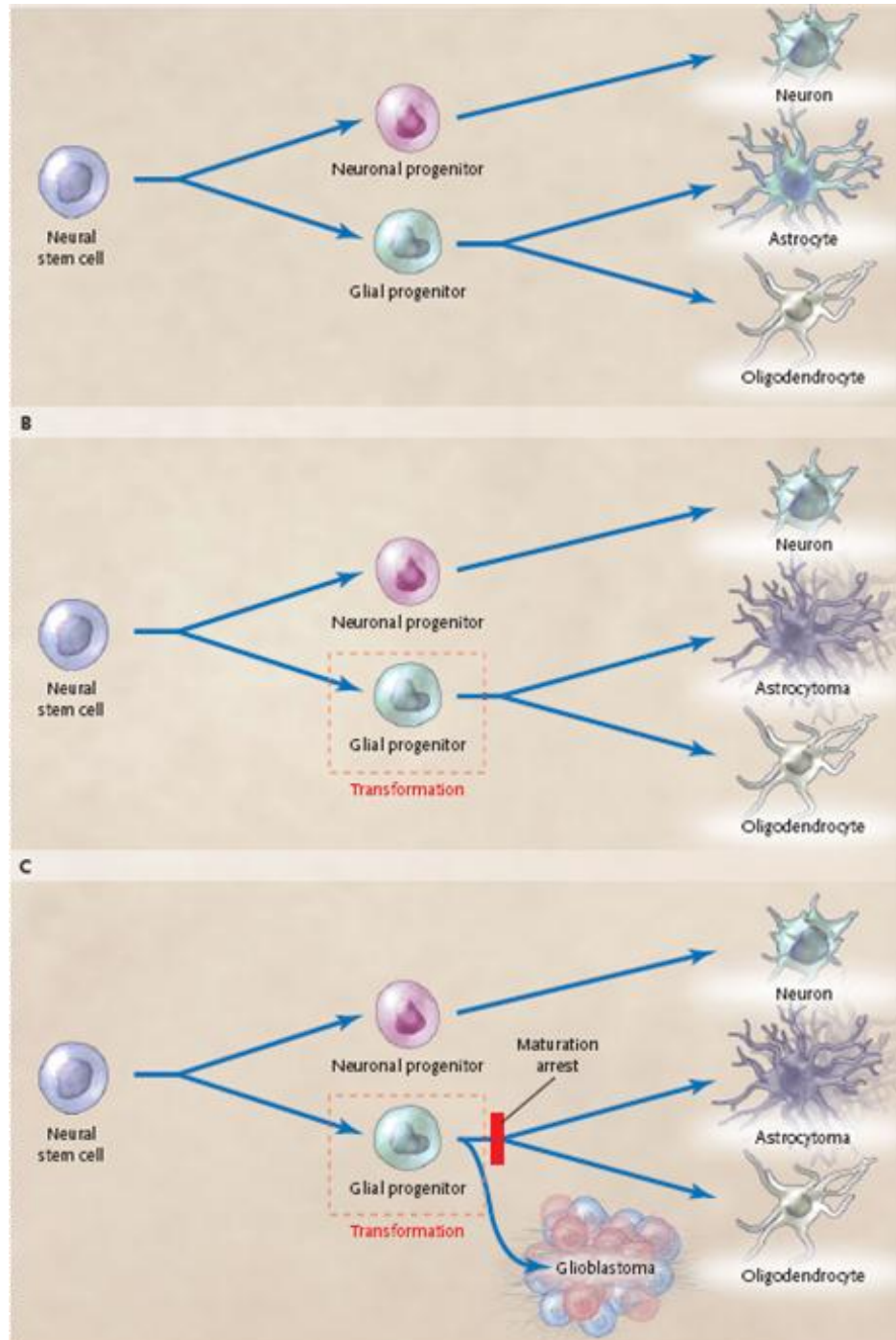
**Figura 6: Histologia em HE de um glioblastoma de camundongo.**

Características como necrose pseudopaliçada (NP) e proliferação microvascular (seta) são comumente encontradas nesse tipo de tumor. Barras representam 100  $\mu$ m. Adaptado de Johansson et al., (2005).

Estes últimos tumores, também denominados glioblastoma multiforme de grau IV ou, simplesmente, glioblastomas como serão designados nesse trabalho, foram classificados como os mais agressivos tumores cerebrais por apresentarem alta proliferação, resistência à radiação e elevada capacidade de invasão no tecido sadio (Avgeropoulos & Batchelor, 1999), afetando estruturas importantes no SNC. Por isso, os sintomas relatados por pacientes que têm esse tipo de tumor são dores de cabeça, convulsões e/ou alterações neurológicas como distúrbios linguísticos e fraqueza em algum membro do corpo. Todas essas características fazem dos glioblastomas a terceira causa mais freqüente de morte por câncer em adultos e a segunda em crianças nos Estados Unidos. Uma vez diagnosticado, geralmente por tomografia computadorizada e ressonância magnética, o prognóstico de vida é de até 12 meses mesmo com tratamentos convencionais como ressecção cirúrgica, seguido de quimio/radio terapia. No Brasil, o último estudo estatístico de tumores cerebrais de um hospital do Paraná, apontou os tumores de origem astrocitária como os mais comuns (36,3%), sendo os glioblastomas a forma predominante (Torres et al., 1990).

A origem desses tumores ainda não está totalmente esclarecida. Por muito tempo acreditou-se que estas neoplasias tinham origem em células diferenciadas, pois elas apresentavam características morfológicas parecidas com o tipo celular de origem, mas evidências recentes apontam para a idéia de que além desse processo, as células cancerígenas possam derivar de células-tronco neurais, com capacidade

de auto-renovação, proliferação e diferenciação (Figura 7) (Sanai, Alvarez-Buylla & Berger, 2005; Singh et al., 2004). O processo de transformação do fenótipo sadio para o tumoral passa por diversas alterações genéticas, das quais depende o grau de malignidade dos gliomas. Esta transição multifatorial envolve dois importantes controles da vida celular: a super-ativação das vias de transdução de sinal e o progresso no ciclo celular.



**Figura 7: Origem dos glioblastomas.**

A) Diferenciação normal das células do sistema nervoso a partir de progenitores neurais. B) Transformação maligna que ocorre em progenitor glial com vias de

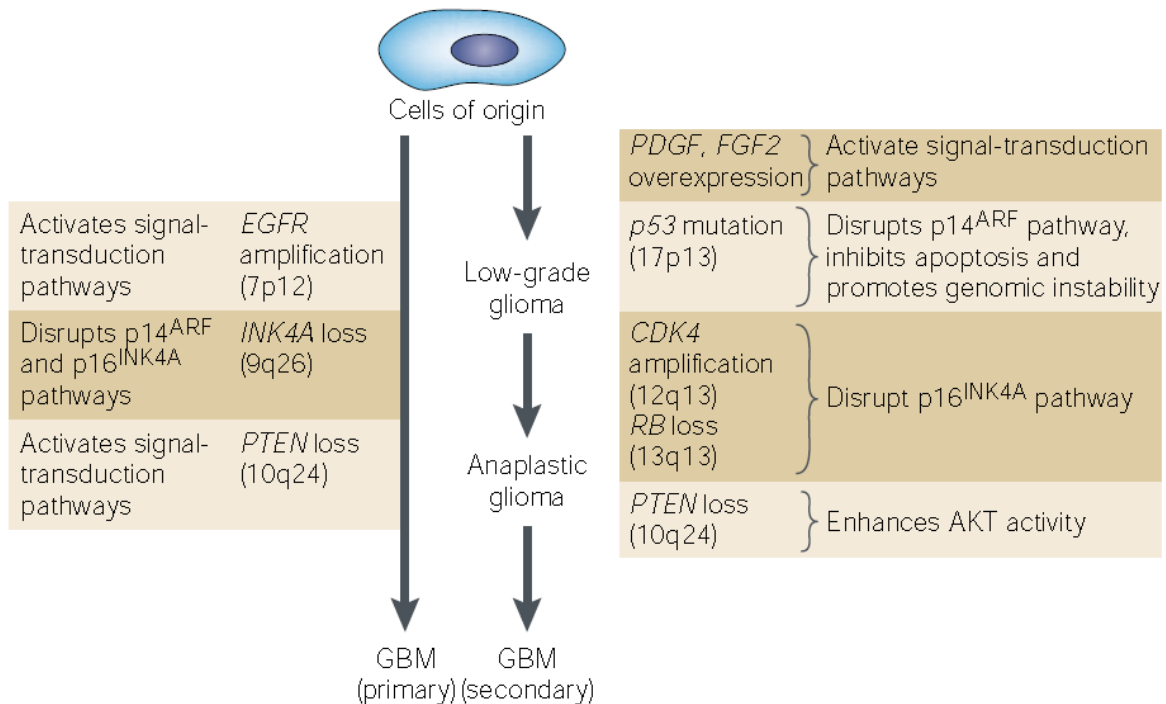
diferenciação ativadas. C) Transformação maligna ocorre em progenitor glial com interrupção da maturação. Retirado de Sanai et al., 2005.

As vias de transdução de sinal mais ativadas em glioblastomas humanos correspondem às vias a jusante dos receptores de tirosina quinase. Por exemplo, amplificações gênicas ou mutações que levam à ativação constitutiva do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (Frederick et al., 2000), receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) (Takahashi et al., 1990; Yamaguchi et al., 1994), e do receptor do fator de crescimento de plaquetas (PDGFR) (Smith et al., 2000) ativam uma série de cascatas de sinalização a jusante que incluem as vias da PI3K (Fosfatidil-inositol-3-quinase)/Akt, da RAS/MAP quinase, da c-myc, da proteína quinase C e da STAT, todas elas envolvidas na sobrevivência celular. De fato, os receptores EGFR estão amplificados ou mutados em 30-50% dos pacientes com glioblastomas, assim como as atividades da RAS e da Akt encontram-se elevadas. Além da ativação dos receptores tirosina quinase, pode ocorrer a mutação ou a ausência do gene da PTEN (Fosfatase e homólogo da tensina deletada do cromossomo dez), a fosfatase que defosforila o principal efetor da atividade da PI3K (Sano et al., 1999). Também a deleção da PTEN é frequentemente relatada em glioblastomas de alto grau.

O outro grupo de alterações relevantes para a gliomagenese resulta no escape da parada no ciclo celular. Nesse grupo, as proteínas controladoras da progressão no ciclo celular estão deletadas como a INK4A-ARF (Fulci et al., 2000; Newcomb et al., 2000) e a proteína retinoblastoma (RB) (Newcomb et al., 2000) ou perdem sua função como a proteína p53 (Shiraishi & Tabuchi, 2003). Pode ainda haver a amplificação da CDK4 (Rollbrocker et al., 1996), CDK6 (Costello et al., 1997), ciclina D1 (Buschges et al., 1999) e MDM2 (Reifenberger et al., 1993). Em gliomas de alto grau, a perda das funções da INK4-ARF e p53 são as alterações mais frequentemente identificadas (Fulci et al., 2000). A proteína supressora de tumor p53, por exemplo, atua como um fator de transcrição responsável pela progressão do ciclo celular e inibe a apoptose frente a sinais de dano ao DNA e mutações oncogênicas (Bogler et al., 1999). Através de modelos de formação de gliomas em animais (Dai & Holland, 2001) foi possível perceber que nenhuma dessas proteínas é responsável única pela transformação oncogênica, mas é necessária a combinação de alterações de ambos os processos biológicos para o surgimento desse tipo de tumor. A ordem em que elas ocorrem ainda não foi



totalmente elucidada, mas acredita-se que influencie pelo menos no tipo de glioblastoma formado (Figura 8).



**Figura 8: Principais alterações genéticas que ocorrem durante a gliomagenese.** Adaptado de Holland, 2001.

### 1.8 Invasão: adesão e migração

A maioria das neoplasias desenvolveu como característica de progressão tumoral a capacidade de utilizar os sistemas sanguíneo e linfático para atingir outros locais do indivíduo num processo de metástase. Ao contrário, glioblastomas raramente fazem metástases (Bernstein & Woodard, 1995), mas suas células apresentam uma especialidade agressivamente invasiva no tecido sadio adjacente. A característica infiltrativa dos glioblastomas deve-se, principalmente, a importantes habilidades das células cancerígenas: adesão e migração. Células individuais de glioblastomas são capazes de se infiltrar em direção ao tecido sadio de 4 a 7 cm a partir da massa tumoral (Silbergeld & Chicoine, 1997). Os passos necessários para a invasão desses tumores são: adesão celular aos componentes da matriz extracelular (MEC), degradação local da MEC através de metaloproteinases (MMPs) e, finalmente, migração celular através da MEC ocupando o espaço recém aberto (Goldbrunner, Bernstein & Tonn, 1999).

As células de glioblastoma invadem o tecido sadio migrando através de estruturas anatômicas preferenciais em humanos, que incluem a membrana basal

de vasos sanguíneos, o espaço subependimal, as limitantes externas da glia e/ou em paralelo ou em intersecção às fibras nervosas na massa branca (Giese & Westphal, 1996). Todas essas estruturas são constituídas por uma variedade de elementos da MEC tais como laminina, colágeno IV, tenascina e ácido hialurônico (Giese et al., 1994; Pilkington, 1996). Especialmente, a membrana basal de vasos contém também o proteoglicano heparan sulfato, colágeno I, fibronectina, vitronectina e entactina. As células, por sua vez, dispõem de um complexo multimérico formado por integrinas, quinases de adesão focal e proteínas associadas à actina (paxilina, talina, vinculina e alfa-actinina) que determinam a sinalização e a migração celular (D'Abaco & Kaye, 2007). De fato, o comportamento invasivo e migratório depende da interação da célula de glioblastoma com componentes específicos da matriz extracelular, o que pode ser comprovado *in vitro* pela preferência dessas células por componentes da MEC como substratos de adesão e migração celular.

Entre os receptores de superfície celular envolvidos na adesão, migração e invasão tumoral destacam-se as integrinas, reconhecidas moléculas de adesão e os receptores de hialuronato CD44. Estes receptores são responsáveis especialmente pela adesão célula-matriz. Entretanto, também se deve considerar a existência de receptores encarregados da adesão célula-célula que influenciam nesses processos. Nesse caso, os receptores mais importantes são as caderinas, as selectinas e membros da superfamília das imunoglobulinas como as moléculas de adesão celular neural (NCAMs), as moléculas de adesão celular intercelular (ICAMs) e as moléculas de adesão celular vascular (VCAMs) (Goldbrunner et al., 1999).

Por tudo isso, torna-se fácil entender que as células de glioblastomas adaptaram a expressão de suas proteínas de modo que aumentem sua adesão à MEC, apresentem expressão aumentada de metaloproteinases e, portanto, deslocam-se mais rapidamente. Por exemplo, vídeos derivados de fotos microscópicas revelaram que a velocidade média de células de glioblastoma cultivadas em monocamada em plástico é de 12,5  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Ao serem cultivadas num substrato de preferência dos glioblastomas, laminina, a velocidade de migração foi aumentada para 50  $\mu\text{m}/\text{h}$  (Chicoine & Silbergeld, 1995). Adicionalmente, células de glioblastoma expressam diversos subtipos de metaloproteinases, entre as quais a gelatinase A (MMP-2) e a gelatinase B (MMP-9) são as mais expressas em nível de mRNA e de proteína (Raithatha et al., 2000; Vince et al., 1997). Como última consideração, é importante ter em mente que durante o processo de locomoção,

embora seja necessária a degradação de MEC, também é preciso que essa degradação não seja completa, mas que sobre ainda um pouco de MEC por onde a célula possa aderir e deslocar-se. Assim como, o avanço celular em direção ao espaço vazio necessita que, no outro pólo celular, as ligações dos receptores de adesão com a MEC ou com outras células sejam liberadas ou clivadas para que ocorra o deslocamento (Bernstein et al., 1998). Isso geralmente acontece através da reciclagem de receptores que diminui suas concentrações na membrana plasmática, além das sinalizações de rearranjo do citoesqueleto (Giese & Westphal, 1996).

### **1.9 Modelo do sistema purinérgico em glioblastomas**

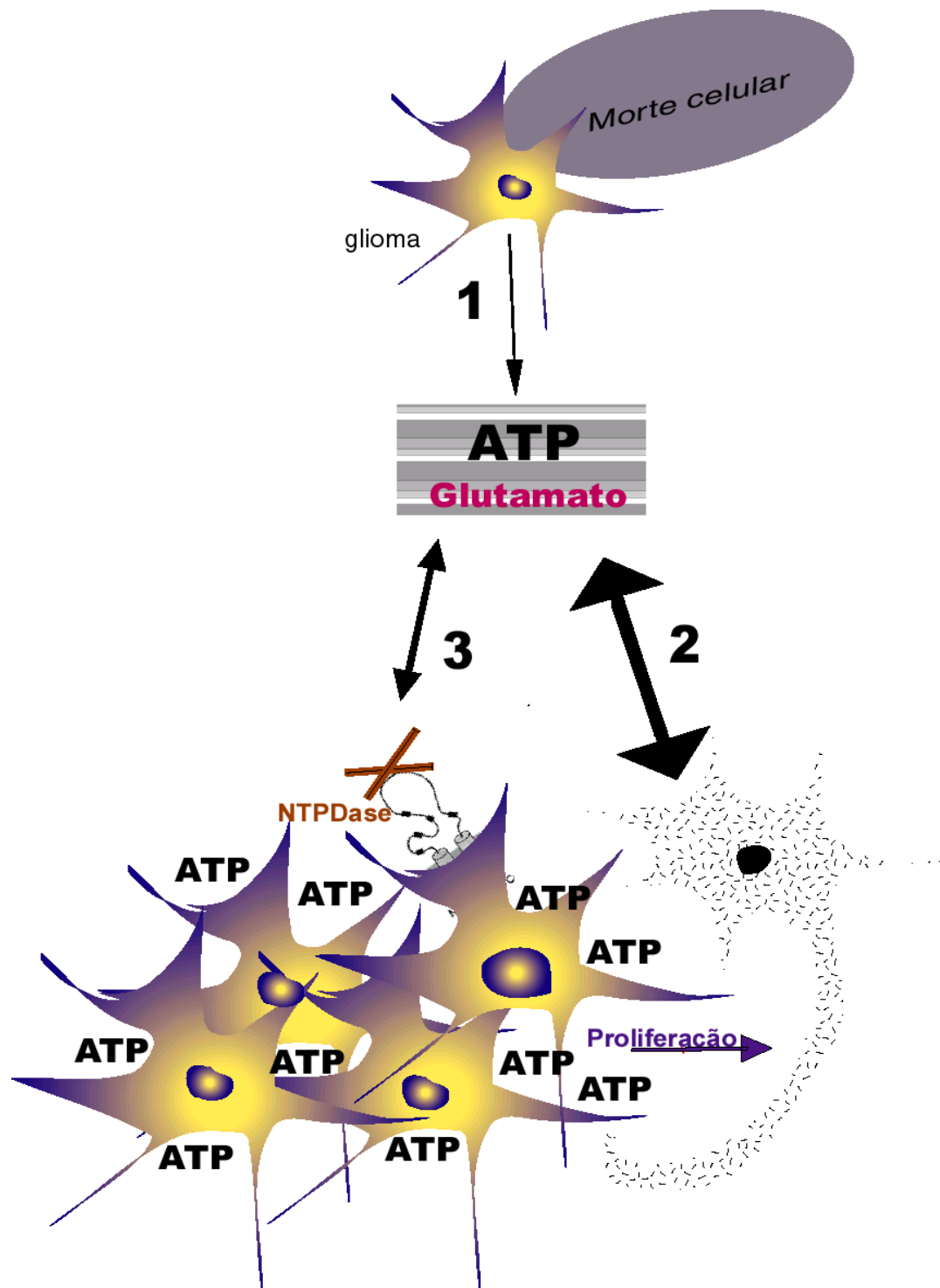
Diversas evidências do nosso grupo têm demonstrado, na última década, que o sistema purinérgico (nucleotídeos, receptores e enzimas) está fortemente envolvido na biologia dos glioblastomas, tanto em processos de proliferação, viabilidade celular *in vitro*, quanto no crescimento e invasão *in vivo*. Inicialmente, foi constatada uma inversão da capacidade de hidrólise de nucleotídeos extracelulares pelos glioblastomas em relação aos astrócitos (Wink et al., 2003). Enquanto os astrócitos são capazes de hidrolisar eficientemente o ATP e em menor escala o ADP e apresentam uma hidrólise de AMP baixa, as linhagens de glioblastoma humano e de rato não possuem essa habilidade de hidrolisar ATP e ADP, mas apresentam alta hidrólise de AMP. Isso configura diferentes cenários extracelulares quanto à concentração dos nucleotídeos, o que resulta também em diferentes estímulos nos receptores purinérgicos. Em concordância com esses dados, o ATP 5 mM é citotóxico para culturas organotípicas, mas não tem efeito deletério em glioblastomas. Pelo contrário, ATP 100  $\mu$ M e adenosina 100  $\mu$ M, que são concentrações mais próximas das fisiológicas no meio extracelular, têm funções proliferativas para as mesmas linhagens de glioblastoma (Morrone et al., 2003). A relevância desse sistema foi reforçada *in vivo*, uma vez que a co-injeção de NTPDase1, enzima que hidrolisa ATP e ADP, com o implante de glioblastomas C6 em cérebro de rato diminuiu significativamente o tamanho do tumor (Morrone et al., 2006).

Embora a NTPDase 2 seja a principal NTPDase expressa pelos astrócitos, o que é condizente com a alta hidrólise de ATP por estas células (Wink et al., 2006), a sua reposição gênica nos glioblastomas resultou em tumores maiores e mais malignos quando implantados em ratos. O tratamento com clopidogrel, antagonista

de P2Y<sub>12</sub>, reverteu esta situação, demonstrando que o ADP gerado pela NTPDase 2 ativou o recrutamento de plaquetas e outros processos de inflamação que facilitaram a progressão tumoral (Braganhof et al., 2009). Isso comprova também que a regulação dos níveis de nucleotídeos extracelulares é finamente controlada pelas NTPDases, com características farmacológicas diferentes, que devem ser levadas em consideração na escolha de alvos para a terapia gênica. Nesse sentido, o silenciamento da ecto-5'NT tem gerado resultados mais promissores na diminuição do crescimento de glioblastomas implantados no cérebro de ratos, diminuindo também características malignas como adesão (Campesato *et al.*, comunicação pessoal). Conquanto que, neste trabalho destaca-se a importância da proteína na malignidade tumoral, sabe-se que o AMP pode diminuir a proliferação celular ao mesmo tempo em que a adenosina tem efeito contrário (Bavaresco et al., 2008).

Além disso, dados da literatura apontam que a concentração de ATP está aumentada em volta do tumor (Pellegatti et al., 2008), cuja origem pode ser tanto da liberação induzida por glutamato excitotóxico em neurônios (Bennett & Boarder, 2000; Queiroz et al., 1999) ou ainda por extravasamento do conteúdo intracelular em caso de injúria do tecido normal. De fato, glioblastomas humanos ativamente liberam glutamato e este aminoácido excitatório está aumentado dentro e na periferia do tumor (Behrens et al., 2000; Ye & Sontheimer, 1999). Em conjunto, estes dados demonstram o papel crucial do sistema purinérgico no crescimento e na invasão tumoral, permitindo construir um modelo (Figura 9) no qual os glioblastomas, através da liberação constante de glutamato citotóxico, induzem a liberação de ATP pelos neurônios ou ainda este ATP seja extravasado dos compartimentos celulares em processo de degeneração. Este ATP em altas concentrações, não degradado pelos glioblastomas, não é deletério para eles, mas induz morte celular em neurônios, abrindo espaço para a invasão tumoral. Ou seja, se para os glioblastomas o ATP e a adenosina são fatores proliferativos, o ADP induz respostas inflamatórias favoráveis ao estabelecimento tumoral e o AMP é anti-proliferativo, significa que estas células desenvolveram mecanismos de defesa dos efeitos deletérios do sistema purinérgico e ao mesmo tempo beneficiaram-se dessas moléculas pela inversão das atividades enzimáticas. Uma vez que, este sistema é formado não só por enzimas e nucleotídeos, mas também por receptores que são os responsáveis por sinalizar os processos celulares, torna-se fundamental e complementar estudar a expressão e funcionalidade dos receptores purinérgicos na biologia de glioblastomas.

O uso de linhagens celulares nas diversas áreas de pesquisa permite um melhor nível de reprodutibilidade, além de uma caracterização molecular específica daquele tipo celular. O estabelecimento de linhagens celulares de glioblastoma de humanos e de roedores permitiu, por exemplo, estudar as principais vias de sinalização que foram alteradas nessa doença e que são hoje alvo de importantes intervenções terapêuticas. A linhagem de glioblastoma de camundongo GL261 foi induzida em cérebro de camundongos C57BL/6 com o agente carcinogênico metilcolantreno por Seligman e Shear em 1939 (Seligman & Shear, 1939). Em 1970, modelos experimentais de desenvolvimento de tumor em cérebros de camundongos com a GL261 já eram uma prática para o estudo de agentes quimioterápicos (Ausman, Shapiro & Rall, 1970). Nesses casos, as células de glioblastoma GL261 eram propagadas subcutaneamente nos camundongos singênicos e as passagens eram feitas a cada 14 dias. Ao longo dos anos, outros trabalhos estabeleceram a GL261 como linhagem, crescida *in vitro*, e que após 12 passagens em meio de cultura DMEM/F12 passava a expressar marcadores como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), mas mantinha o potencial de formação de tumor em cérebros de camundongos (Andreansky et al., 1998; Lumniczky et al., 2002; Natsume et al., 1999). As células de GL261 facilmente adaptam-se ao crescimento *in vitro*, não apresentam inibição de crescimento por contato, carregam mutações nos genes da K-ras e da p53 e crescem agressivamente em camundongos C57BL/6, constituindo um bom modelo de glioma *in vivo* (Szatmari et al., 2006). Modelos animais de crescimento de tumor a partir de linhagens são muito importantes, uma vez que permitem avaliar o crescimento tumoral com todas as interações celulares do tecido sadio. Esta possibilidade de avaliação do crescimento tumoral *in vivo* fez da linhagem GL261 uma das escolhas desse trabalho.



**Figura 9: Modelo proposto para o envolvimento do ATP extracelular na progressão tumoral.**

As células do glioma, através da liberação de glutamato e outras substâncias, causam a morte celular do tecido que circunda o tumor, levando à liberação de fatores cuja concentração intracelular é elevada, como o ATP e o próprio glutamato (seta 1). Estes fatores induzem a morte neuronal que, por sua vez causam uma maior liberação de ATP e glutamato (seta 2). Como a degradação do ATP pelos gliomas é extremamente baixa, pela deleção das NTPDases 1 e 2 e como os gliomas são resistentes à morte por ATP, o nucleotídeo permanecerá acumulado nas bordas do tumor, contribuindo ainda mais para o processo de retro-alimentação positiva entre morte neuronal, liberação de ATP e glutamato e consequentemente proliferação e invasão do glioma (seta 3). Retirado de (Wink et al., 2003).

## 2 OBJETIVO

Considerando que as células tumorais de glioblastoma apresentam resistência à morte induzida por ATP extracelular; que os receptores purinérgicos P2Xs, principalmente o subtipo P2X7, é mediador da citotoxicidade do ATP em diversos tipos celulares e, ainda, que os glioblastomas que tenham alterado suas respostas do sistema purinérgico tenham vantagem seletiva *in vitro* e *in vivo*, o objetivo deste trabalho foi investigar a expressão e a funcionalidade do receptor P2X7 em células de glioblastomas.

Este trabalho foi dividido em dois objetivos específicos apresentados na forma de artigo científico:

**Capítulo 1:** caracterizar a morte celular induzida por ATP na linhagem de células de glioblastoma de camundongo GL261.

**Capítulo 2:** investigar a expressão do receptor P2X7 em biópsias de paciente com glioblastoma e relacionar com características de malignidade em linhagem de glioblastoma GL261 silenciada para o mesmo receptor.

### **3 CAPÍTULOS – ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### **3.1 Capítulo 1**

## **Characterization of ATP-induced Cell Death in the GL261 Mouse Glioma**

Artigo publicado no periódico Journal of Cellular Biochemistry



## Characterization of ATP-Induced Cell Death in the GL261 Mouse Glioma

Alessandra S.K. Tamajusuku,<sup>1</sup> Emily S. Villodre,<sup>1</sup> Romela Paulus,<sup>1</sup>  
Robson Coutinho-Silva,<sup>2</sup> Ana M.O. Battastini,<sup>3</sup> Márcia R. Wink,<sup>4</sup> and Guido Lenz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UFRGS, Departamento de Biofísica, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup>UFRGS, Departamento de Bioquímica, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup>UFCSA, Departamento de Bioquímica, Porto Alegre, RS, Brazil

### ABSTRACT

Gliomas have one of the worst prognosis among cancers. Their resistance to cell death induced by endogenous neurotoxic agents, such as extracellular ATP, seems to play an important role in their pathobiology since alterations in the degradation rate of extracellular ATP drastically affects glioma growth in rats. In the present work we characterized the mechanisms of cell death induced by extracellular ATP in a murine glioma cell line, GL261. ATP and BzATP, a P2X7 agonist, induced cell death at concentrations that are described to activate the P2X7 receptor in mouse.  $\alpha$ ATP, an antagonist of P2X7, blocked the ATP-induced cell death. Agonists of purinergic receptors expressed in GL261 such as adenosine, ADP, UTP did not cause any cell death, even at mM concentrations. A sub-population of cells more sensitive to ATP expressed more P2X7 when compared to a less sensitive subpopulation. Accordingly, RNA interference of the P2X7 receptor drastically reduced ATP-induced cell death, suggesting that this receptor is necessary for this effect. The mechanism of ATP-induced cell death is predominantly necrotic, since cells presented shrinkage accompanied by membrane permeabilization, but not apoptotic, since no phosphatidylserine externalization or caspase activity was observed. These data show the importance of P2X7 in ATP-induced cell death and shed light on the importance of ATP-induced cell death in glioma development. *J. Cell. Biochem.* 109: 983–991, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** GLIOBLASTOMA MULTIFORME; GLIOMA; NECROSIS; PURINOCEPTOR; P2X7

Extracellular ATP has well described roles in several physiological processes like vascular tonus, pain sensation, neurotransmission, cell proliferation, differentiation, and death [Burnstock, 2006]. The specific purinergic receptors that mediate these effects are classified into P1 receptors ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ , and  $A_3$ ), which are activated by nucleosides and P2 receptors that respond to nucleotides, which are further subdivided in metabotropic P2Y (P2Y 1, 2, 4, 6, 11–14) and ionotropic P2X subtypes (P2X1–7) [Burnstock, 2006].

Among the P2X receptors, the P2X7 subtype possesses unique biological properties such as the opening of a pore through which

molecules up to 900 Da can pass. However, this pore opening requires prolonged exposure to ATP in the low millimolar range and the presence of associated proteins [Surprenant et al., 1996; Pelegrin and Surprenant, 2006]. P2X7 is responsible for ATP-induced cell death in various cell types through mechanisms that involve necrotic features such as swelling, loss of membrane integrity and apoptotic features, such as shrinking and phosphatidylserine (PS) externalization [Tsukimoto et al., 2005; Taylor et al., 2008].

In the central nervous system, ATP is highly toxic to neurons in vitro and ex vivo [Morrone et al., 2005] and extracellular ATP plays an important role in neuronal death in pathological conditions such

Abbreviations used: BzATP; benzoil-benzoil adenosine 5'-triphosphate; MIT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide;  $\alpha$ ATP; oxidized adenosine 5'-triphosphate; TNP-ATP; 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS); Grant number: 0410419; Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Grant number: 473190/2004.

\*Correspondence to: Dr. Guido Lenz, Departamento de Biofísica - IB - UFRGS, Rua Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43431 - Lab. 107, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: lenz@ufrgs.br

Received 30 September 2009; Accepted 1 December 2009 • DOI 10.1002/jcb.22478 • © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Published online 12 January 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

as ischemia and trauma [Wang et al., 2004; Cavaliere et al., 2007]. Neuronal death induced by oxygen and glucose deprivation of hippocampal organotypic cultures was blocked by the P2X7 antagonist  $\alpha$ ATP [Cavaliere et al., 2004] and a broad P2X antagonist, TNP-ATP [Cavaliere et al., 2007], but knockout of the P2X7 receptor did not affect the sensitivity of mice to ischemia in vivo [Le Feuvre et al., 2003] indicating that multiple receptors may be involved in neuronal death in this pathological condition. Glial cells, on the other hand, are mostly resistant to ATP-induced cell death and ATP acts as a mitogen in astrocytes, activating pro-survival pathways such as PI3K/Akt and ERK [Lenz et al., 2000, 2001; Jacques-Silva et al., 2004]. It is interesting to notice that mouse neural progenitor cells (NPCs), which are capable of differentiation into neurons, astrocytes and oligodendrocytes, are sensitive to extracellular ATP with a pharmacological and molecular profile that suggests the involvement of P2X7. Notably, NPCs from P2X7 KO mice were much more resistant to extracellular ATP [Delarasse et al., 2009].

Gliomas are the most aggressive tumors of CNS, in part, due to their unique ability to rapidly invade the neighboring tissue, thus making surgical resection and radiotherapy much more difficult. Part of this tumor invasion seems to be due to the liberation of neurotoxic molecules, such as ATP and/or glutamate, by the gliomas and by the surrounding dying cells that open up space for tumor invasion [Takano et al., 2001]. Most gliomas examined have a rate of extracellular ATP degradation that is around three orders of magnitude lower when compared to astrocytes [Wink et al., 2003], thus allowing a build up of this molecule around the tumor. Besides the neurotoxic effect, ATP can also induce proliferation of several kinds of glioma cells lines [Morrone et al., 2003]. The importance of extracellular ATP for glioma pathobiology was confirmed by the reduction in glioma tumor size by the injection of apyrase, which degrades extracellular ATP to AMP [Morrone et al., 2006], and the striking increase in tumor size by over-expression of an ecto-enzyme that degrades ATP to ADP [Braganhol et al., 2009], suggesting that ATP is liberated and that the effect on the tumor growth depends on the nucleotide produced by its degradation.

Here we show that the mouse glioma cell line GL261 is sensitive to high concentrations of ATP and by pharmacological and genetic strategies show that this effect is mediated by the P2X7 receptor. The mechanism of cell death is mainly necrotic, not presenting clear apoptotic features. This characterization will contribute to the understanding of the importance of the purinergic system and of cell death induced by endogenously liberated molecules in tumor biology of gliomas.

## MATERIALS AND METHODS

### REAGENTS AND CELL CULTURE

Reagents, ATP, ADP, AMP, Bz-ATP,  $\alpha$ ATP, TNP-ATP, PPADS, suramin, reactive blue and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma (St. Louis, MO), except when specified. Mouse GL261 glioma cell line was a generous gift of Dr. Ilker Eyüpoglu, University of Zurich. All cells were maintained in culture flask in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). In the experiments with purinergic antagonist, the

drugs were added to culture medium 15 min before the nucleotide exposure, except  $\alpha$ ATP that was added 30 min before.

### STABLE RNA INTERFERENCE

Mouse P2RX7 (GeneID: 18439) was knocked down (KD) by transduction of cells with lentivirus produced with the plasmid clone ID NM\_011027.1-1368s1c1 from the Mission RNAi library from Sigma-Aldrich. Non-target (SHC002V) sequence was used as a control. Lentiviruses were produced by co-transfecting the Mission RNAi plasmid with the helper plasmids pRSVREV, pVSV-G and pMDLgRRE [Dull et al., 1998] in sub-confluent Hek293T cells with Superfect Reagent (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Three days after transfection, supernatant was collected every 2 days during 1 week, filtered through a 0.45  $\mu$ m membrane and used immediately or stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . One milliliter of virus containing medium was added to target cells, also at sub-confluent stage (15,000 cells/well) in 24-well plates, together with 8  $\mu$ g/ml of polybrene overnight. Cells were allowed 48 h to express the selection marker and were then selected with 5.5  $\mu$ M puromycin for at least 10 days. KD was confirmed by Western blotting.

### ASSESSMENT OF GLIOMA CELL VIABILITY

Loss of membrane integrity was measured through lactate dehydrogenase (LDH) release, in which the cell medium was withdrawn and transferred to an eppendorf tube on ice, centrifuged for 1 min at 10,000 rpm and an aliquot of the supernatant was used for enzymatic assay using a LDH kit available from Doles Reagents following the manufacturer's protocol. Results were expressed as percentage of 0.5% Triton X-100-induced LDH release. For PI incorporation, cells were exposed to agonists concomitantly with 1  $\mu$ M PI. After the indicated times, pictures were taken on Carl Zeiss Fluorescence Inverted Microscope fitted with a standard rhodamine filter. Positive control cells received 0.5% Triton X-100. Alternatively, the number of permeabilized cells was quantified using ViaCount<sup>®</sup> Reagent, which contains PI as an indicator of permeabilization, and analyzed in a Guava EasyCyte flow cytometer (Guava Technologies, Hayward, CA).

Mitochondrial viability was assessed using the MTT assay. Briefly, glioma cells were seeded on 96 multiwell plates and allowed to grow until confluence, treated and incubated for 4 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in MTT solution (0.25 mg/ml of MTT dissolved in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ -free buffer). Formazan crystals, formed by tetrazolium cleavage, were dissolved with 100  $\mu$ l of DMSO for 10 min and quantified at 560 and 630 nm using a Spectramax Spectrofotometer.

Phosphatidylserine (PS) externalization was determined by annexin fluorescent signal of Annexin-V FITC conjugate (Gibco/Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. GL261 cultures treated or not with ATP, were trypsinized, centrifuged for 5 min at 2,000 rpm and the supernatant discarded. The pellet was resuspended with 100  $\mu$ l of Annexin Binding Buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) and incubated with annexin 0.5  $\mu$ l/sample and PI 18  $\mu$ M for 15 min at room temperature in the dark and analyzed on Guava EasyCyte flow cytometer. Cisplatin 16.6  $\mu$ M was used as positive control for apoptosis.

TABLE I. Primers for Purinergic Receptors Used at PCR (RT-PCR and qRT-PCR) Experiments

Primer	Sense	Antisense
P2X1	5'-AAGGTCAACAGGCGCAACC-3'	5'-AACACCTTGAAGAGGTGACG-3'
P2X2	5'-GTGCAGAAAAGTACCAGG-3'	5'-GGATGGTGAATTTGGGGC-3'
P2X3	5'-GCTGCGTGAACACAGCTC-3'	5'-ACTGGTCCCAGGCCTTGC-3'
P2X4	5'-CTTGGATTCCGGATCTGGG-3'	5'-GGAATATGGGGCAGAAGGG-3'
P2X5	5'-GCACCTGTGAGATCTTTGC-3'	5'-TCGGAAGATGGGGCAGTAG-3'
P2X6	5'-CAGGACCTGTGAGATCTGG-3'	5'-TCCTGCAGCTGGAAGGAGT-3'
P2X7	5'-TCCCTTGCAGGGAACTC-3'	5'-GTACGGTGAAGTTTCGGC-3'
P2Y1	5'-TGTTCAATTGGCTCTGGC-3'	5'-AGATGAAATAAATTCGACAG-3'
P2Y2	5'-CTTCGCCCTCTGCTTCTG-3'	5'-TTGGCATCTCGGGCAAAGC-3'
P2Y4	5'-GGCATTGTGACAGACCTTG-3'	5'-AAGACAGTCAGCACCACAG-3'
P2Y6	5'-CGCTTCTCTTATGCCA-3'	5'-AGGCTGCTTGGTGATGTG-3'
P2Y11	5'-CTTCTCTTACCTGCAAC-3'	5'-AGGCTATACGCTCTGTAGG-3'
P2Y12	5'-GACTACAAGATCACCCAGG-3'	5'-CCTCCTGTTGGTGAGAATC-3'
P2Y13	5'-GCCGACTTGATAATGACAC-3'	5'-ATGATCTTGAGGAACTGTG-3'
P2Y14	5'-TCTTTTACGTGCCAGCTC-3'	5'-CTGTCAAAGCTGATGAGCC-3'

### RT-PCR ANALYSIS

Total RNA from glioma cell cultures were isolated with Trizol LS reagent (Life Technologies) and chloroform-isopropanol extraction. The cDNA was synthesized with M-MLV Reverse Transcriptase enzyme (Promega) from total RNA with oligo (dT) primer. One microliter of the RT reaction mix was used as a template for PCR using a concentration of 0.5  $\mu$ M of each primer indicated below, in Table I, and 0.5 units of Taq DNA polymerase (CenBiot-UFRGS). As a control for cDNA synthesis,  $\beta$ -actin PCR was performed. The PCR cycling conditions were as follows: 1 min at 95°C, 1 min at 94°C, 30 s at 60°C, 45 s at 72°C and a final 10 min extension step at 72°C for 40 cycles. Products of the PCR reaction were analyzed on a 1% agarose gel stained with 1  $\times$  SYBR Green for gel staining (Molecular Probes). SYBR Green I-based real-time PCR was carried out on Applied-Biosystem 7500 real-time cyler as described [Andrade et al., 2008]. All results were analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [Livak and Schmittgen, 2001].  $\beta$ -Actin was used as the internal control gene for all relative expression calculations. All samples were run in triplicate and the data were presented as ratio of P2X7/ $\beta$ -actin. The primers used for real time PCR were the same used in RT-PCR analysis.

### WESTERN BLOT ANALYSIS

To determine P2X7 immunocontent, glioma cell cultures were washed twice with cold PBS and homogenized in lysis buffer (4% sodium dodecylsulfate (SDS), 2.1 mM EDTA and 50 mM Tris). Aliquots were taken for protein determination [Peterson, 1983] and  $\beta$ -mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%. Forty micrograms of protein were separated on 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad, CA) and electrotransferred to PVDF membranes. Membranes were blocked and further incubated with polyclonal anti-P2X7 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1:200, 1 h at room temperature. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:2,000) for 2 h at room temperature and the chemiluminescence was detected using X-ray films (Kodak X-Omat, Rochester, NY). The films were scanned and the percentage of band intensity was analyzed using Image J software (NIH).

### STATISTICAL ANALYSIS

The data obtained was expressed as % of control and presented as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments unless otherwise stated. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test and comparison among multiple groups was performed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. Values were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### MOUSE GL261 GLIOMAS ARE SENSITIVE TO ATP

ATP treatment of the mouse glioma cell line GL261 lead to cell roundup, membrane permeabilization to propidium iodine (PI) (Fig. 1A) and release of LDH, which peaked at around 2 h to reach around 70% of maximum LDH release (Fig. 1B). This lead to loss of cell viability, as measured by MTT assay, confirming that concentrations above 1 mM of ATP effectively killed these cells (Fig. 1C,D).

### EXPRESSION OF PURINERGIC RECEPTOR AND PHARMACOLOGICAL PROFILE OF ATP-INDUCED CELL DEATH

GL261 gliomas express mRNA for several purinergic receptors, which include A2a, P2X1, P2X3-7, P2Y2, P2Y6, P2Y12, and P2Y14 (Fig. 2A). Activation of the A2a receptor with adenosine, P2Y2 and P2Y6, with UIP and P2Y12 with ADP, did not exert toxic effect on GL261 cells, even at the 5 mM dose (Fig. 2B). BzATP, an agonist of the P2X7 receptor, with an EC<sub>50</sub> of 936  $\mu$ M for the mouse receptor [Young et al., 2007], induced cell death with an EC<sub>50</sub> of about 1.0 mM (Fig. 1C). TNP-ATP, considered a broad P2X antagonist, but that does not block P2X7, had no effect on ATP-induced cell death, whereas oxidized ATP (oATP), a P2X7 antagonist, completely prevented the effect of ATP in a dose-dependent fashion (Fig. 2D and Supplementary Fig. 1A), indicating that the activation of P2X7 is essential for the toxic effect of ATP in GL261. Among the non-specific purinergic antagonists tested, only PPADS partially reverted the ATP-induced death. Mg<sup>2+</sup> ions, which block the effect of ATP by decreasing its binding to the receptor, also blocked the toxic effects of ATP (Supplementary Fig. 1B).

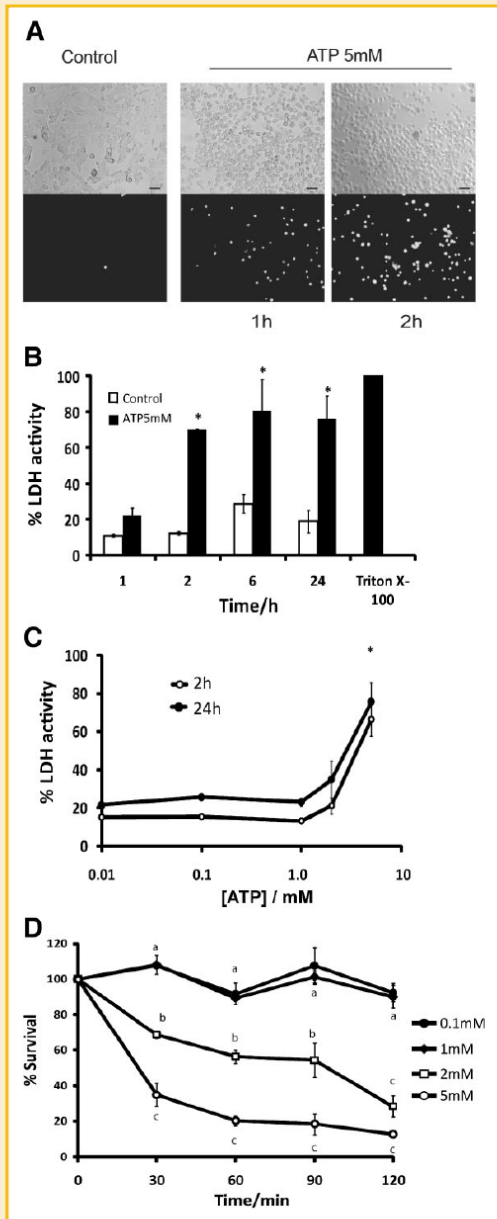


Fig. 1. The mouse glioma cell line GL261 is killed by ATP. ATP leads to cell roundup and membrane permeabilization to PI (A) and loss of membrane integrity in a dose- and time-dependent way, as measured by LDH release (B,C). The results are expressed as % of the positive control treated with 0.5% Triton X-100 (n = 3). \**P* < 0.05; Cell viability was also accessed by MTT assay (D). a versus b versus c *P* < 0.05, a versus c *P* < 0.001. Bars represent 200 μm.

CELLS MORE SENSITIVE TO ATP EXPRESS MORE P2X7 RECEPTOR

In order to establish whether there is a correlation between sensitivity to cell death and P2X7 expression, we acutely treated GL261 cells with 5 mM ATP and collected the detached cells after 20 min, a time point in which about half of the cells came off the dish. The detached subpopulation presented more P2X7 mRNA and protein when compared to the adherent subpopulation, indicating that the subpopulation of cells with more P2X7 expression were more susceptible to ATP (Fig. 3A,B). No differences were found in the mRNA of the other P2X receptors (Fig. 3C), corroborating the importance of P2X7 in the ATP-induced cell death.

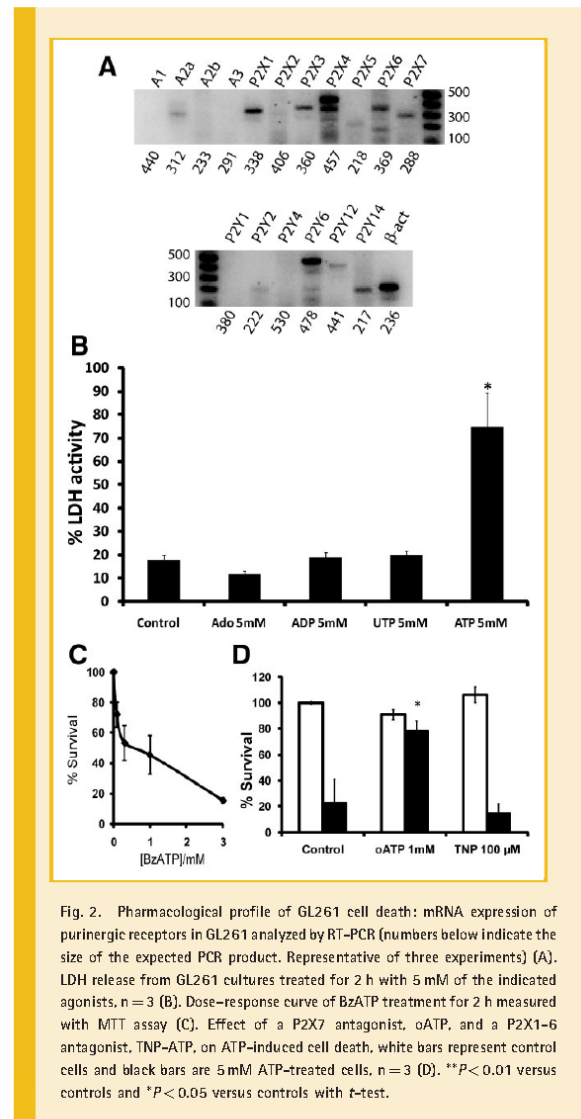
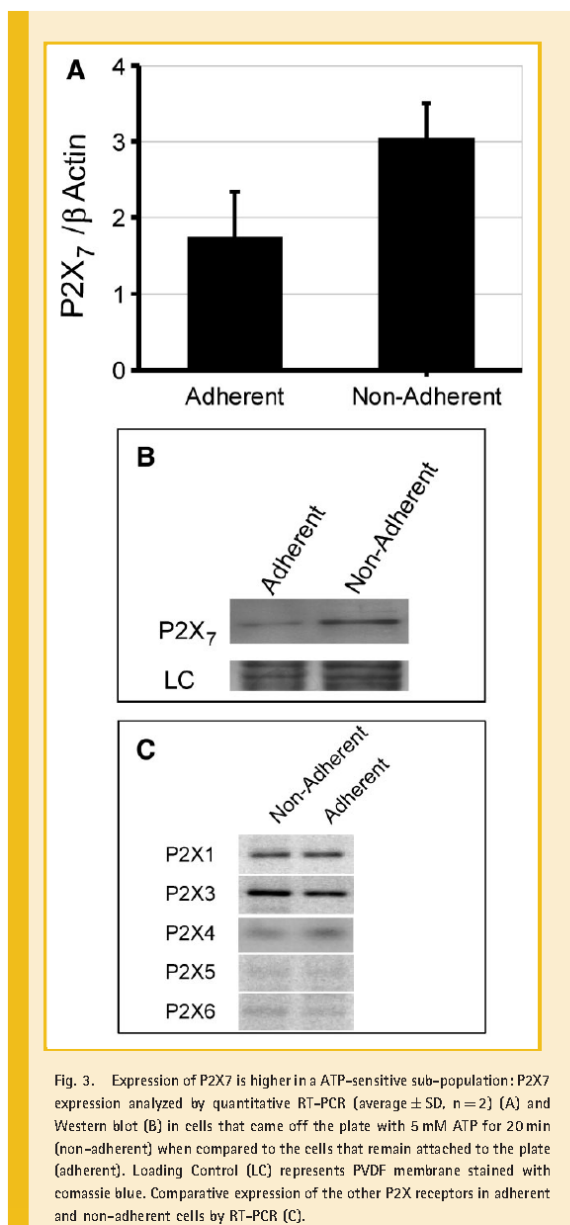


Fig. 2. Pharmacological profile of GL261 cell death: mRNA expression of purinergic receptors in GL261 analyzed by RT-PCR (numbers below indicate the size of the expected PCR product. Representative of three experiments) (A). LDH release from GL261 cultures treated for 2 h with 5 mM of the indicated agonists, n = 3 (B). Dose-response curve of BzATP treatment for 2 h measured with MTT assay (C). Effect of a P2X7 antagonist, oATP, and a P2X1-6 antagonist, TNP-ATP, on ATP-induced cell death, white bars represent control cells and black bars are 5 mM ATP-treated cells, n = 3 (D). \*\**P* < 0.01 versus controls and \**P* < 0.05 versus controls with *t*-test.



#### SILENCING OF P2X7 DRASTICALLY REDUCES ATP-INDUCED CELL DEATH

Considering the pharmacological profile of cell death, together with the enrichment of P2X7 receptor in the more sensitive cells, we set out to silence P2X7 receptor with stable shRNA. P2X7 expression, as verified by Western blotting, was reduced by more than 90% in the P2X7 knockdown (KD) cells (Fig. 4A). KD cells presented no detectable morphological alteration when compared to wild type (WT) cells under normal growth conditions (Fig. 4B). Upon ATP treatment, WT cells rounded up and came off the culture plate while

KD cells did not present significant alterations in morphology, similarly to WT cells treated with the P2X7 antagonist, oATP (Fig. 4B). Both 3 and 5 mM ATP lead to a significant increase in PI permeabilization within 2 h in WT cells or cells transduced with the non-target shRNA sequence (data not shown) while only a mild increase in PI positive cells was observed with 5 mM ATP in KD cells (Fig. 4B,C). It is important to notice that LDH liberation remained at the basal level in KD cells, even at 5 mM ATP (Fig. 4D) suggesting that KD cells probably open up some pores through which PI can pass, but this is not sufficient for the induction of membrane rupture and release of LDH.

Previously we showed that several glioma cell lines are resistant to ATP-induced cell death [Morrone et al., 2005]. A rat glioma cell line (C6) and two human gliomas cell lines (U138 and U87) which are resistant to 5 mM of ATP as verified by LDH activity (Fig. 5A), presented similar P2X7 receptor expression when compared to GL261 cells (Fig. 5B) suggesting that the presence of P2X7 is not sufficient for ATP-induced glioma cell death.

#### ATP-INDUCED CELL DEATH WITH NECROTIC BUT NOT APOPTOTIC FEATURES

ATP treatment induced a clear increase in the PI-positive population, without an increase of the annexin V-positive population (Fig. 6A,B), in strong contrast with the positive control, cisplatin (Supplementary Fig. 2A). The lack of apoptosis in response to ATP is confirmed by the absence of caspase 3/7 activity in cells treated with 5 mM ATP for 2 h (Supplementary Fig. 2B) or 24 h (data not shown).

Treatment with ATP lead to a clear shrinkage of the cells, as indicated to the left-shift in the forward scatter analysis of cells treated with ATP (Fig. 6, compare panels D with F) and this shrinkage did not differ between the PI-positive and negative population, suggesting that permeabilization to PI and shrinkage are events that are not causally linked. This is further supported by the observation that P2X7 KD significantly reduced permeabilization to PI but did not significantly affect shrinkage (Fig. 6, compare panels H and F), suggesting that the latter is mediated by another P2 receptor.

These results suggest that permeability to PI, probably due to P2X7 channel to pore transition is an important part of cell death induced by ATP, and that KD of P2X7 reduces the amount of receptor to a level which allows the entry of PI in some cells but does not reach the threshold needed for cell rupture.

#### DISCUSSION

In the present report we show that ATP induces cell death of the mouse glioma cell line GL261 and that this effect requires the activation of the P2X7 receptor. This is supported by the pharmacological profile, with cell death being induced by concentrations of ATP and BzATP, a P2X7 agonist, in the concentration range described for the mouse P2X7 activation together with the blockage of ATP-induced cell death by oATP, a P2X7 antagonist. Additionally, the lack of toxic effects found by high concentrations of ADP, adenosine or UTP, P1 and P2Y agonists, suggests that the activation of receptors whose mRNA was found in GL261, such as A<sub>2a</sub>, P2Y2, P2Y6, P2Y12, or P2Y14 are not

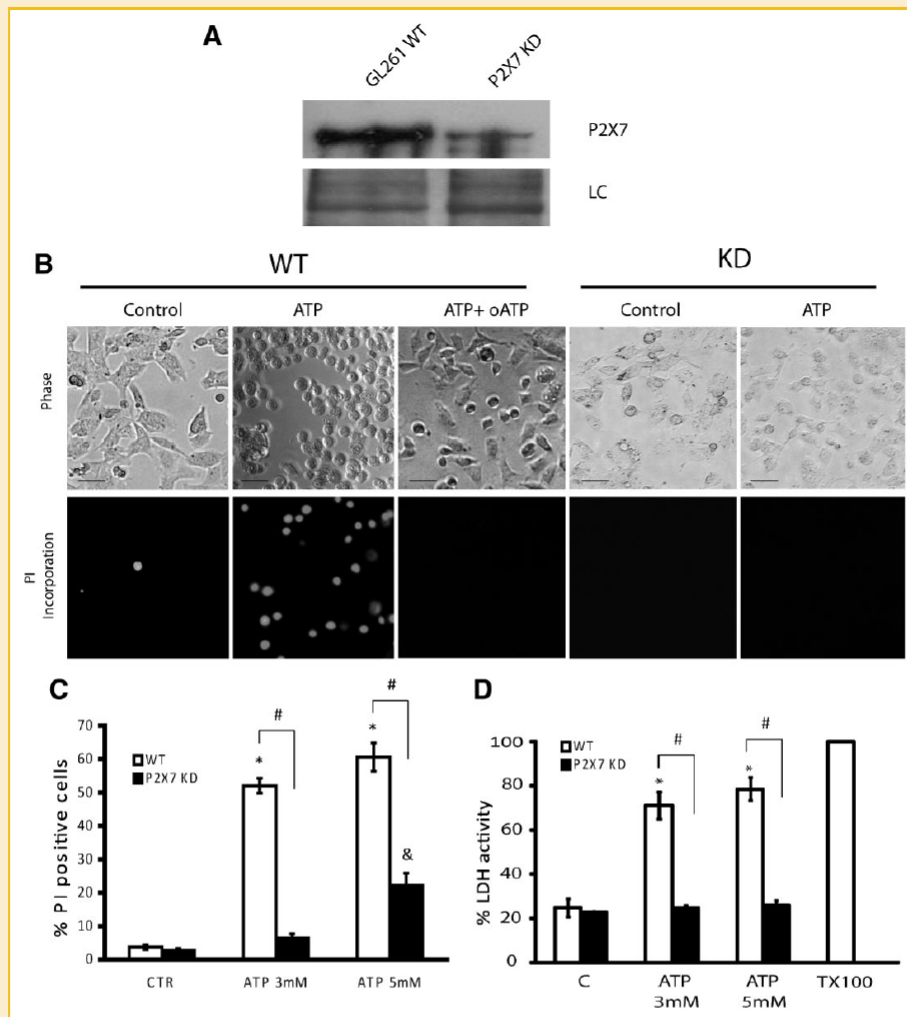


Fig. 4. P2X7 is necessary for ATP-induced cell death in gliomas. Stable silencing of P2X7 via lentiviral-mediated transduction of shRNA reduced P2X7 expression in GL261 as shown by Western blotting (A). Morphological changes and PI incorporation in WT or P2X7 KD cells treated with 5 mM ATP in the presence or not of 1 mM of oATP. Bars represent 50  $\mu$ m (B). PI positive cells quantified by flow cytometry (C) and LDH liberation (D) of WT or KD of cells treated with 3 or 5 mM of ATP for 2 h. \* $P < 0.05$  and & $P < 0.01$  when compared to untreated. # $P < 0.05$  and & $P < 0.01$  when compared to WT cells (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

responsible for the toxicity of ATP or its degradation products. Differential expression of P2X7 mRNA and protein in sub-populations with different sensitivities to ATP indicate that the more sensitive sub-population expresses more P2X7, while the expression of other P2X receptors was not positively or negatively selected. Most importantly, the KD of P2X7 in GL261 produced a cell line resistant to 5 mM ATP, indicating that this receptor is necessary for the ATP-induced cell death in GL261. P2X7 receptor, despite being necessary for ATP-induced cell death in GL261, is not sufficient for ATP-induced cell death in gliomas in general, since other glioma cell lines express similar levels of P2X7 when compared to GL261, but are resistant to 5 mM ATP. This suggests

that, in these gliomas, P2X7 is either inactive by mutation or truncation or the expression of accessory proteins that are necessary for mediating the toxic effects of ATP, such as pannexin, is lacking [Pelegri and Surprenant, 2006].

Cell death induced by activation of P2X7 is strongly dependent on cell type. There are reports of classical apoptosis or necrosis as the predominant cell death mechanism [Coutinho-Silva et al., 2005; Tsukimoto et al., 2005], but, in the majority of cases, a mixed feature of cell death mechanisms was found, mainly with apoptosis and necrosis co-occurring. Since none is dominant, the block of apoptosis generally does not prevent cell death [Auger et al., 2005; Jun et al., 2007]. Even a pseudoapoptotic mechanism was proposed

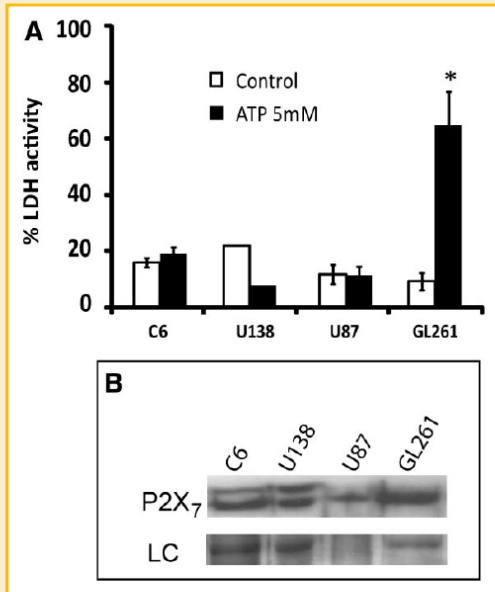


Fig. 5. P2X7 receptor presence is not sufficient to trigger ATP-induced cell death. Rat (C6) or human (U138 and U87) glioma cell lines were treated with 5 mM of ATP for 2 h and LDH activity was measured (A). Level of P2X7 expression was evaluated by Western blotting (B). Loading Control (LC) represents PVDF membrane stained with comassie blue. \* $P < 0.05$  versus controls with  $t$ -test.

for P2X7-mediated cell death, in which cells presented mitochondrial depolarization with swelling, PS flip, membrane blebbing but without subsequent cell death [Mackenzie et al., 2005]. We observed a cell death that presents predominant necrotic features, such as membrane permeabilization and rupture. The observation that ATP-induced some increase in PI positive cells without leading to any LDH liberation in P2X7 KD cell suggests that a threshold of receptor activation has to be reached for cell rupture, but not for P2X7 pore opening and entry of PI [Greenberg et al., 1988].

Apoptosis is normally preceded by cell shrinkage whereas necrosis is preceded by swelling [Okada and Mak, 2004]. We observed cell shrinkage, but that was not accompanied by PS externalization neither by caspase 3/7 activation, suggesting that apoptosis is not the mechanism of ATP-induced cell death in GL261. Additionally, the observation that the rate of cells that shrunk was not different for the PI positive and negative population suggests that these events are not causally linked but rather co-occurring. This is further supported by the shrinkage observed in P2X7 KD cells, but which was not accompanied by a large permeabilization and, most importantly, cell death. Others have observed cell shrinkage induced by P2X7 activation in lymphocytes, but this was accompanied by PS externalization [Taylor et al., 2008; Tsukimoto et al., 2005]. Recently, Takenouchi et al. [2009] reported that activation of P2X7 receptor lead to a decrease in autophagy in microglial cells, through the impairment of lysosomal function. Preliminary data indicate that ATP reduces autophagy in GL261 cells and that P2X7 KD does not significantly affect this reduction induced by ATP, suggesting that autophagic cell death does not play an important role in ATP-induced cell death and that P2X<sub>7</sub> does not regulate autophagy in GL261 cells.

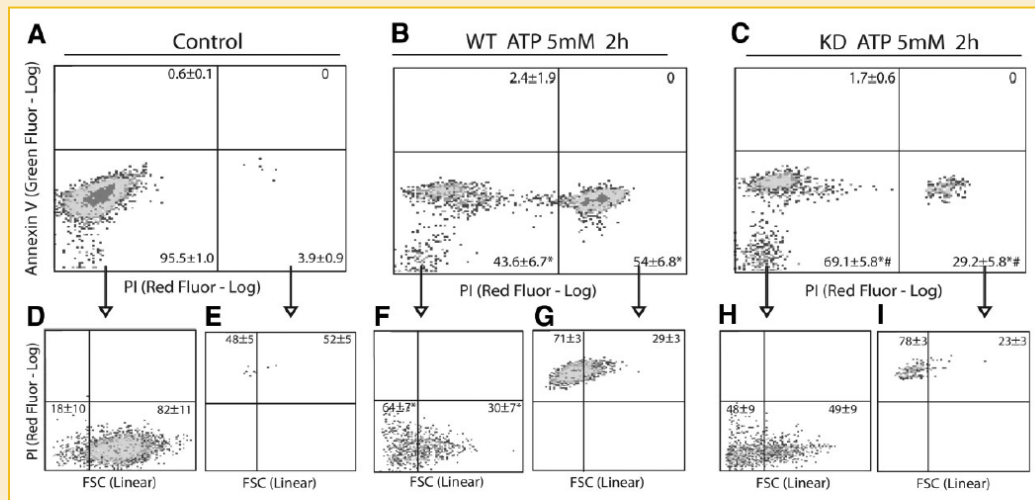


Fig. 6. ATP-induced cell death involves membrane permeabilization, cell shrinkage but not PS externalization. WT or KD cells were treated with 5 mM ATP for 2 h and analyzed by flow cytometry with Annexin V and PI. Panels A–C: Annexin V staining × PI incorporation. Panels D–I: Cell size (Forward Scatter, FSC) plotted against PI incorporation of the indicated populations. Values refer to average of the percentage of cells in each gate of six independent experiments ± SEM. \* $P < 0.05$  versus WT control cells and # $P < 0.05$  versus WT ATP 5 mM (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

Several reports point to stem cells as the origin of gliomas, although this is still an area of dispute, mainly due to uncertainties about the promoter activities in the different neural stem cells [Shih and Holland, 2004]. Neural progenitor cells (NPCs) are sensitive to ATP [Delarasse et al., 2009], with several similarities to cell death induced by ATP in GL261, which include: (i) dose-response to ATP and BzATP; (ii) inhibition of ATP-induced cell death by oATP, (iii) time curve of LDH release, (iv) lack of involvement of caspases, and (v) an almost complete dependence of the expression of P2X7, as evidences by the reduction of ATP-induced cell death of NPCs obtained from P2X7 KO mice. On the other hand, there are many differences in ATP-induced death between GL261 and neurons such as protection of the latter but not the former by the P2X1-6 antagonist TNP-ATP [Cavaliere et al., 2004, 2007] and only a mild reduction of death by P2X7 KO in neurons, but a large reduction by P2X7 KD in GL261. Considering that astrocytes are resistant to ATP-induced cell death, these suggests that GL261, at least regarding sensitivity to ATP, are more similar to NPCs than to differentiated CNS cells.

The purinergic system plays a role in the growth of gliomas, which was evidenced by the induction of proliferation of gliomas by ATP *in vitro* [Morrone et al., 2003] and the extremely low ecto-ATPase activity in gliomas when compared to astrocytes [Wink et al., 2003]. *In vivo* models showed that expression of ecto-enzymes that degrade ATP alter tumor growth depending of the product of ATP degradation. Presence of apyrase, which degrades ATP to AMP, produced a reduction of C6 rat glioma growth [Morrone et al., 2006] whereas expression of ecto-NTPDase2, an enzyme that degrades ATP in ADP, increased tumor size [Braganhol et al., 2009]. This suggests that ATP and the purinergic system is a significant player in the biology of glioma tumors and suggests that ATP is present at the tumor site and may affect survival depending on the sensitivity of the glioma cells to ATP.

GL261 is a well-established glioma cell line that can grow in the brain of mice [Szatmari et al., 2006], suggesting that sensitivity to high concentrations of ATP does not totally abrogate *in vivo* glioma growth. There are indirect evidences that extracellular ATP reaches levels needed for P2X7 activation in the CNS, since elimination of pathogenic T lymphocytes is higher in wild-type mice when compared to P2X7 KO in experimental autoimmune encephalomyelitis [Chen and Brosnan, 2006]. It is not clear, however, if gliomas experience concentrations of ATP high enough to induce cell death, but the higher ecto-ATPase activity of GL261 (data not shown) when compared to the glioma cells lines that are resistant to ATP [Wink et al., 2003] may suggest that GL261 could use this ATPase activity to protect itself against ATP that may accumulate around the tumor.

P2X7 has been linked to various types of cancer, mainly by correlative observations such as overexpression, found in prostate [Slater et al., 2004a], breast [Slater et al., 2004b], skin [Greig et al., 2003], neuroblastoma [Raffaghello et al., 2006], leukemia [Mackenzie et al., 2005], and thyroid papillary carcinoma [Arcella et al., 2005]. A large multicentric study showed that patients that have gliomas with high expression of P2X7 mRNA present longer survival when compared to patients with gliomas that express less P2X7 mRNA [The-Cancer-Genome-Atlas, 2008] thus supporting the

notion that P2X7 presents an anti-tumor effect for gliomas. On the other hand, in neuroblastoma cells, P2X7 activation was shown to lead to an increase in tumor growth through substance P release [Raffaghello et al., 2006].

Tumor growth leads to the production and accumulation of several substances normally not found in healthy tissue and, although the majority of tumor cells evolved to be immune, and even strive, on these substances, the modulation of their response on the tumor cells may lead to molecules or genetic therapies aimed at sensitizing the tumor cells to the naturally occurring molecules, such as ATP, that accumulate around the tumor.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Ilker Eyüpoglu, University of Zurich for GL261 cell line donation, Dr. Rogério Margis for Sybr Green reagent and Dr. Fabiana Horn for apoptosis reagents and technical help. A.S.K.T. and G.L. are Recipient of CNPq Fellowships

## REFERENCES

- Andrade CMB, Roesch GC, Wink MR, Guimarães EML, Souza LF, Jardim FR, Guaragna RM, Bernard EA, Margis R, Borjevic R, Battastini AMO, Guma FCR. 2008. Activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 are increased during phenotype conversion of a hepatic cell line. *Life Sci* 82: 21-29.
- Arcella A, Carpinelli G, Battaglia G, D'Onofrio M, Santoro F, Ngomba RT, Bruno V, Casolini P, Giangaspero F, Nicoletti F. 2005. Pharmacological blockade of group II metabotropic glutamate receptors reduces the growth of glioma cells *in vivo*. *Neuro-oncology* 7:236-245.
- Auger R, Motta I, Benihoud K, Ojcius DM, Kanellopoulos JM. 2005. A role for mitogen-activated protein kinase(Erk1/2) activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *J Biol Chem* 280:28142-28151.
- Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppel D, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AM. 2009. Selective NTPDase2 expression modulates *in vivo* rat glioma growth. *Cancer Sci* 100:1434-1442.
- Burnstock G. 2006. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 58:58-86.
- Cavaliere F, Amadio S, Sancesario G, Bernardi G, Volonte C. 2004. Synaptic P2X7 and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:392-398.
- Cavaliere F, Amadio S, Dinkel K, Reymann KG, Volonte C. 2007. P2 receptor antagonist trinitrophenyl-adenosine-triphosphate protects hippocampus from oxygen and glucose deprivation cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 323:70-77.
- Chen L, Brosnan CF. 2006. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R<sup>-/-</sup> mice: Evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol* 176:3115-3126.
- Coutinho-Silva R, Stahl L, Cheung KK, de Campos NE, de Oliveira Souza C, Ojcius DM, Burnstock G. 2005. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: Effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G1024-G1035.
- Delarasse C, Gonnord P, Galante M, Auger R, Daniel H, Motta I, Kanellopoulos JM. 2009. Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J Neurochem* 109:846-857.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72:8463-8471.



- Greenberg S, Di Virgilio F, Steinberg JH, Silverstein SC. 1988. Extracellular nucleotides mediate  $Ca^{2+}$  fluxes in J774 macrophages by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 263:10337-10343.
- Greig AV, Linge C, Healy V, Lim P, Clayton E, Rustin MH, McGrouther DA, Burnstock G. 2003. Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *J Invest Dermatol* 121:315-327.
- Jacques-Silva MC, Rodnight R, Lenz G, Liao Z, Kong Q, Tran M, Kang Y, Gonzalez FA, Weisman GA, Neary JT. 2004. P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br J Pharmacol* 141:1106-1117.
- Jun DJ, Kim J, Jung SY, Song R, Noh JH, Park YS, Ryu SH, Kim JH, Kong YY, Chung JM, Kim KT. 2007. Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. *J Biol Chem* 282:37350-37358.
- Le Feuvre RA, Brough D, Touzani O, Rothwell NJ. 2003. Role of P2X7 receptors in ischemic and excitotoxic brain injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:381-384.
- Lenz G, Gottfried C, Luo Z, Avruch J, Rodnight R, Nie WJ, Kang Y, Neary JT. 2000. P2Y purinoceptor subtypes recruit different mek activators in astrocytes. *Br J Pharmacol* 129:927-936.
- Lenz G, Goncalves D, Luo Z, Avruch J, Rodnight R, Neary JT. 2001. Extracellular ATP stimulates an inhibitory pathway towards growth factor-induced cRaf-1 and MEKK activation in astrocyte cultures. *J Neurochem* 77:1001-1009.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Mackenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A. 2005. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem* 280:33968-33976.
- Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, Bernardi A, Schwartzmann G, Rodnight R, Lenz G. 2003. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurooncol* 64:211-218.
- Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJ, Salbego CG, Lenz G, Battastini AM. 2005. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurooncol* 71:135-140.
- Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Battastini AM. 2006. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer* 6:226.
- Okada H, Mak TW. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4:592-603.
- Pelegri P, Surprenant A. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071-5082.
- Peterson GL. 1983. Determination of total protein. *Methods Enzymol* 91:95-119.
- Raffaghello L, Chiozzi P, Falzoni S, Di Virgilio F, Pistoia V. 2006. The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res* 66:907-914.
- Shih AH, Holland EC. 2004. Developmental neurobiology and the origin of brain tumors. *J Neurooncol* 70:125-136.
- Slater M, Danieletto S, Gidley-Baird A, Teh LC, Barden JA. 2004a. Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology* 44:206-215.
- Slater M, Danieletto S, Pooley M, Cheng Teh L, Gidley-Baird A, Barden JA. 2004b. Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* 83:1-10.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735-738.
- Szatmari T, Lumniczky K, Desaknai S, Trajceviski S, Hidvegi EJ, Hamada H, Safrany G. 2006. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci* 97:546-553.
- Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M. 2001. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med* 7:1010-1015.
- Takenouchi T, Nakai M, Iwamaru Y, Sugama S, Tsukimoto M, Fujita M, Wei J, Sekigawa A, Sato M, Kojima S, Kitani H, Hashimoto M. 2009. The activation of P2X7 receptor impairs lysosomal functions and stimulates the release of autophagolysosomes in microglial cells. *J Immunol* 182:2051-2062.
- Taylor SR, Gonzalez-Begne M, Dewhurst S, Chimini G, Higgins CF, Melvin JE, Elliott JJ. 2008. Sequential shrinkage and swelling underlie P2X7-stimulated lymphocyte phosphatidylserine exposure and death. *J Immunol* 180:300-308.
- The-Cancer-Genome-Atlas. 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061-1068.
- Tsukimoto M, Harada H, Ikari A, Takagi K. 2005. Involvement of chloride in apoptotic cell death induced by activation of ATP-sensitive P2X7 purinoceptor. *J Biol Chem* 280:2653-2658.
- Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng WG, Wan P, Li P, Xu Q, Liu QS, Goldman SA, Nedergaard M. 2004. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10:821-827.
- Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartzmann G, Sarkis JJ, Battastini AM. 2003. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett* 198:211-218.
- Young MT, Pelegri P, Surprenant A. 2007. Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol Pharmacol* 71:92-100.

**Supplementary Data:****Legends to Supplementary Figures:**

**Supplementary Figure 1.** Dose-response effect of oATP on cell death induced by 3mM and 5mM of ATP for 2h as measured with MTT assay (A) and the effect of antagonists of purinergic receptors and Mg<sup>2+</sup> ions on ATP-induced death as measured by LDH liberation (B). \*p<0.05 vs respective control, one-way ANOVA, following Tukey post-hoc test.

**Supplementary Figure 2.** Cells treated for 48h with 16.6µM of cisplatin were used as a positive control for Annexin V staining (A). Fluorigenic caspase 3 activity of cells treated with 5mM ATP for 2h and analyzed immediately thereafter. Treatment with 1 µM etoposide for 24h was used as positive control (C).

**Methods:**

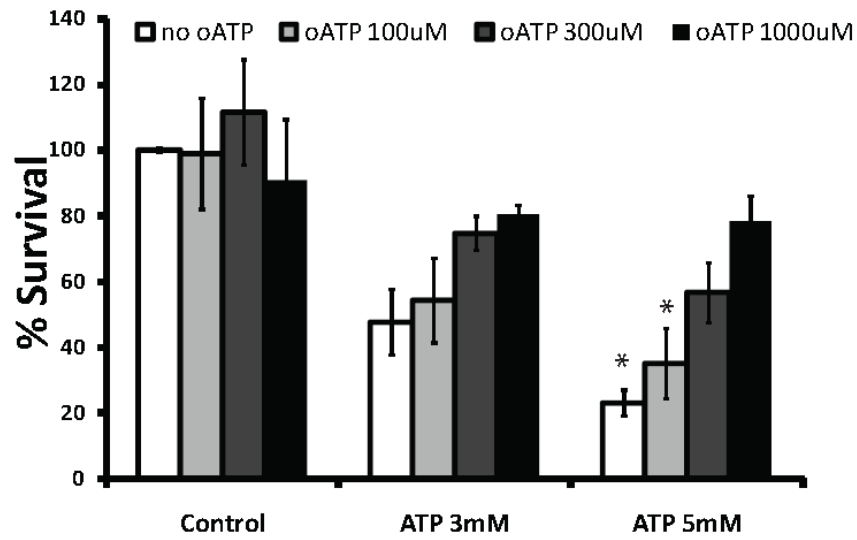
Caspase activity was measured by the cleavage of the fluorogenic synthetic substrate for caspase-3/7 Ac-DEVD-MCA (Peptide Institute, Osaka, Japan). Cells treated with etoposide as positive control, as previously described (Morrone et al., 2005).

**Reference:**

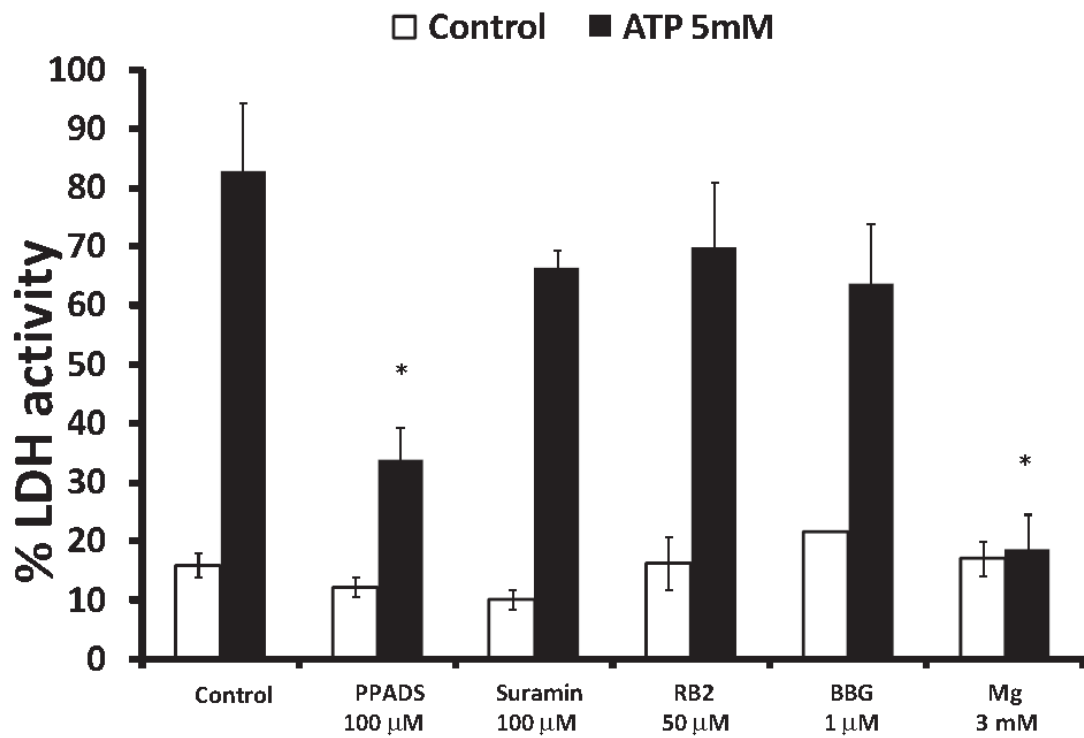
Morrone, F.B., A.P. Horn, J. Stella, F. Spiller, J.J. Sarkis, C.G. Salbego, G. Lenz and A.M. Battastini, 2005, Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity, J Neurooncol 71, 135.

## Supplementary Figure 1

A



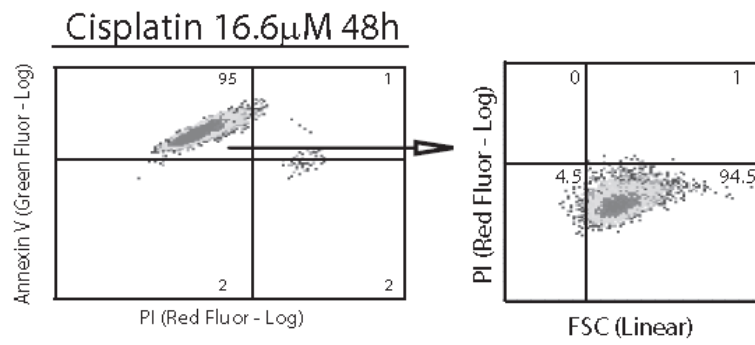
B



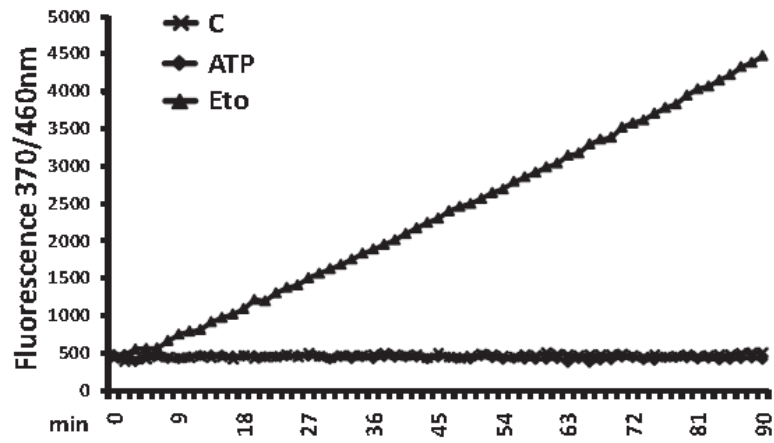
Tamajusuku et al.

## Supplementary Figure 2

A



B



## 3.2 Capítulo 2

# P2X7 Purinergic Receptor Expression Directly Correlates with Survival of Patients with Glioblastomas: Role in Adhesion and Migration

Artigo a ser submetido ao periódico Cancer Letters

**P2X7 purinergic receptor expression directly correlates with survival of patients with glioblastoma: Role in adhesion and migration**

**Alessandra S. K. Tamajusuku<sup>1</sup>, Franciele C. Kipper<sup>1,4</sup>, Débora G. Flores<sup>2</sup>, Gleice M. Reder<sup>1</sup>, Luise Meurer<sup>2</sup>, Ana M.O. Battastini<sup>3</sup>, Rafael Roesler<sup>2</sup>, Márcia R. Wink<sup>4</sup> and Guido Lenz<sup>1,5#</sup>**

<sup>1</sup> UFRGS, Departamento de Biofísica, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> UFRGS, Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> UFRGS, Departamento de Bioquímica, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> UFCSPA, Departamento de Bioquímica, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup> UFRGS, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, RS, Brazil

# Corresponding author: Dr. G. Lenz

Departamento de Biofísica – IB – UFRGS

Rua Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43431 – Lab. 107

CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, BRASIL

TEL: +55 51 3308 7620

FAX +55 51 3308 7309

e-mail: [lenz@ufrgs.br](mailto:lenz@ufrgs.br)

## Abstract

P2X7 is an ionotropic receptor, whose activation by extracellular ATP can cause pro- or anti-apoptotic responses, depending on the concentration of the ligand. This receptor is expressed in almost all the cellular types of central nervous system and has been linked to cell death in several cell types. Gliomas are the most deadly brain tumor due to their high proliferation, migration and infiltrative nature. Here, we show that the increased expression of P2X7 purinergic receptor positively correlates with patients' survival when analyzed with immunohistochemistry at protein level or microarray at the mRNA in a different set of patients from "The Cancer Genome Atlas" database. One possible role of P2X7 receptor in glioma biology may be related to cell adhesion and migration. P2X7 knockdown in a glioma cell line that expresses a functional P2X7 receptor by stable RNA interference decreases cell adhesion and promotes migration. Since these are features of more aggressive cancers, this could be part of the explanation for the correlation observed in patients' outcome. This data support the importance of the purinergic system in general and the P2X7 receptor particularly in the pathobiology of gliomas.

**Key words:** glioma, P2X7 receptor, adhesion, migration, patient survival

## Introduction

The ionotropic P2X7 receptor belongs to the purinergic receptor family that responds to ATP binding by opening a channel permeable mainly to calcium ions. This receptor has an extended C-terminal end that confers to this receptor the possibility of pore formation upon long exposure to ATP concentration above 1 mM. P2X7 is broadly expressed and several roles were ascribed to P2X7 in the Central Nervous System, which include cell death of neurons [1, 2] or neural progenitor cells [3], activation of the pro-survival pathway PI3K/Akt in astrocytes [4], autophagy in microglia [5], and even microglial activation and cellular proliferation [6].

Glioblastomas are the most aggressive brain tumors because of their highly invasive nature coupled to high proliferation and resistance to cell death. This infiltrative nature is the hallmark of poor prognosis and high recurrence index even after surgical resection and radio- and chemotherapy [7]. The steps required to glioma invasion are cell adhesion to extracellular matrix (ECM) components, ECM degradation and migration [8]. Cell attachment and migration are driven by diverse proteins involved in cell signaling and movement, in particular a protein complex that includes integrins, focal adhesion kinases (FAK) and the actin-associated proteins paxillin, talin, vincullin and  $\alpha$ -actinin [9]. These proteins were shown to be important for glioblastoma progression.

P2X7 expression in cancer is considerably variable, with the majority of tumors, such as prostate [10], breast [11], thyroid [12] and pancreatic [13] cancer presenting P2X7 upregulation. A positive correlation between receptor function and tumor aggressiveness was observed for chronic lymphocytic leukemia [14]. In cases of skin carcinomas, P2X7 distribution in the tissue may help to differentiate between benign lesions and malignant tumors [15]. On the other hand, in uterine epithelial cancer, P2X7 protein is clearly downregulated, and this feature has even been suggested as a biomarker in this tumors diagnosis [16]. In melanoma [17], intestine epithelial carcinoma [18] and mouse glioma cells [19], P2X7 mediates cell death, while in neuroblastoma [20] and rat glioma [21] the same receptor triggers responses such as proliferation and migration, respectively. Independent of the cancer type, P2X7 purinergic receptor seems to be involved and plays a role in the malignant state.

Here we found that higher expression of P2X7 correlates with higher survival of patients with glioblastoma and that silencing of P2X7 receptor in a glioblastoma cell line leads to a reduction in adhesion and an increase in migration, which may be part



of the mechanisms involved in the effect that P2X7 expression has on glioblastoma patients outcome.

## Material and Methods

### • Immunohistochemistry

Eighteen histological samples of human gliomas were collected between January 2004 and June 2008 from patients who underwent surgical resection at the Pathology Department from the University Hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul (HCPA-UFRGS; Porto Alegre, Brazil) and the diagnostic were made by a pathologist. All patients signed an informed consent allowing the use of part of the removed tissue for scientific purposes. Samples were obtained in accordance with approved ethical standards of the institutional research ethics committee (GPPG document number 08-259, HCPA-UFRGS). The biopsies were processed as previously described [22], briefly, they were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin blocks. Five micrometer serial cryostat sections were deparaffinized in xylene and dehydrated in a graded ethanol series. Anti-P2X7 antibody was used at the dilution of 1:100 and revealed by streptavidin-biotin staining. The samples were lightly counterstained with hematoxylin-eosin (HE). P2X7 expression was quantified by WCFI Image J software (NIH) (<http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/>) as follows: the immuno-histochemistry sample images, taken at the same light intensity, were submitted to colour deconvolution at "Plugins/Colour Functions" with "H&E DAB". The DAB image generated was quantified by using "Analyse/Measure" as previously described [22]. Patients were divided according to P2X7 expression above and below de median expression and survival of the two independent groups were evaluated in a Kaplan-Meier survival plot.

### • mRNA expression and correlation with Patient's survival

The results published here are in whole or part based upon data generated by The Cancer Genome Atlas Pilot Project established by the NCI and NHGRI. Information about TCGA and the investigators and institutions who constitute the TCGA research network can be found at <http://cancergenome.nih.gov>. The Kaplan-Meier survival plot was generated in TCGA Data Portal powered by CaBIG: <https://cma.nci.nih.gov/cma-tcga/> with the following entries: 'p2rx7', as gene symbol, 'all\_patients' as sample group and 'Affimetrix microarray (GBM: Broad) Affy HT Human Genome U133', as array platform, on march 22<sup>nd</sup>, 2010.

### • Stable Transduction and Western Blot

P2X7 interference was performed by lentiviral transduction of GL261 wild type as described before [19] using the plasmid clone ID NM\_011027.1-1368s1c1 from the

Mission RNAi library from Sigma-Aldrich. Control of transduction was made with shGFPi plasmid (SHC005V). Western blot experiments was done as previously described [19] with polyclonal anti-P2X7 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1:200, and confirmed the reduction of P2X7 protein expression.

- **Cristal Violet Staining**

GL261 cell lines were seeded in 96-well plates in densities of 30,000, 50,000 and 100,000 cells per well and incubated for 90 minutes in cell incubator with 5 % CO<sub>2</sub>, at 37° C. After that, the cells were washed with PBS to remove non-adherent cells, fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.5 % crystal violet diluted in 20% methanol. After 10 min, cells were washed with milli-Q water and the crystals were dissolved in 10 % acetic acid and quantified at 570 nm using a Spectramax Spectrofotometer. The results were expressed as percentage of control cells' absorbance, that was considerate as 100%.

- **Scratch Wound Assay**

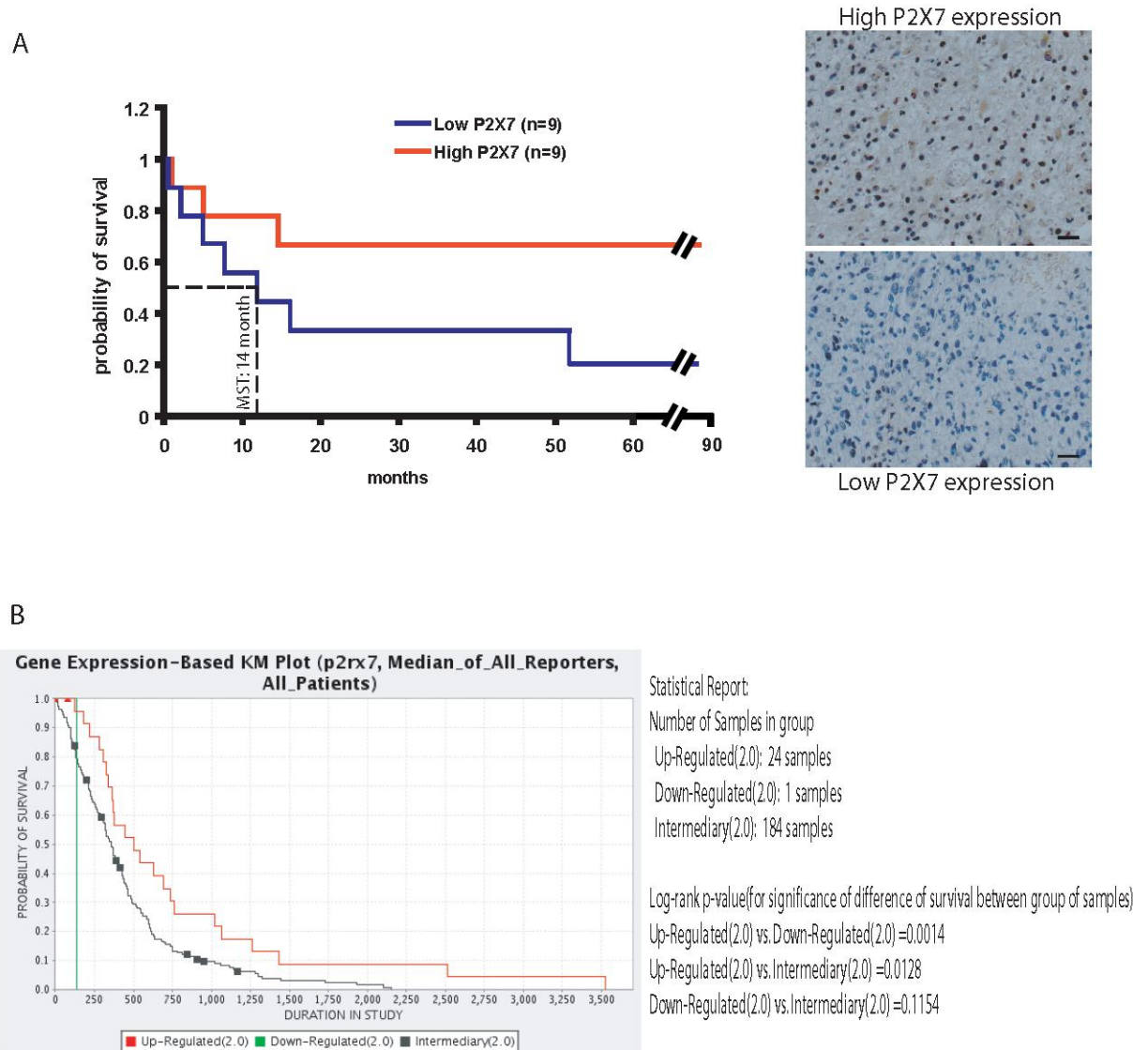
Semi-confluent cultures of GL261 GFPi and P2X7 KD cells, seeded one day before in 6 well plates, were scratched with a 200 µL tip in three different locations in the well. The culture was washed with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>-free buffer and the complete medium was replaced. Pictures of each wound were taken in different times (0, 4, 6, 12, 24 and 30 hours) and the cell migration distance between the borders was analyzed with Image J software (NIH). Results were plotted as percentage of initial width of the wound.

## Results

- ***High P2X7 expression is a good prognostic factor for survival of patients with glioblastoma***

An analysis of P2X7 expression versus patient survival showed that patients whose glioblastoma biopsies presented high P2X7 protein expression presented longer survival than patients whose glioblastomas presented low P2X7 expression (Fig 1A). Patients whose glioblastomas have a P2X7 protein expression below the median value had a median survival time (MST) of 14 months, whereas patients with high P2X7 expression had a MST higher than 80 months. Using The Cancer Genome Atlas Pilot Project as a database, a similar result was found: 209 patients in whom mRNA expression of the majority of genes was analyzed with microarrays also found that patients with increased P2X7 mRNA expression have significantly higher MSTs when compared to tumors expressing P2X7 in the intermediary and lower level (Fig 1B).

Figure 1

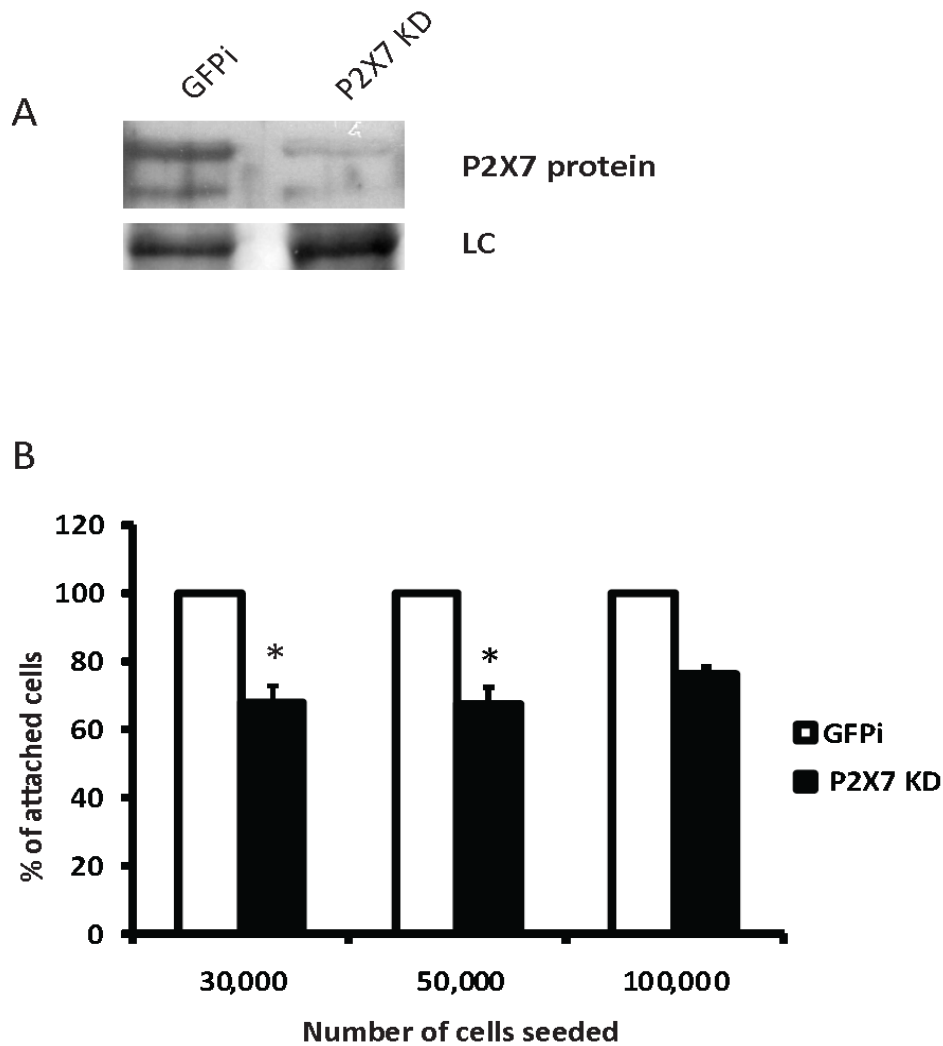


**Figure 1. High P2X7 expression in glioma increased patients survival.** Survival curve of 18 patients with glioma considering P2X7 protein expression above (high) and below (low) the median expression level. Representative pictures of immunohistochemistry of P2X7 in gliomas with high and low P2X7 protein expression (A). Bars represent 100  $\mu$ m. Survival curve of 209 patients with gliomas from the Cancer Genome Atlas study considering P2X7 mRNA expression analysed by microarray (B).

- ***P2X7 silencing reduces adhesion capacity in GL261 cells***

Once we found a positive correlation of P2X7 expression and patient survival, we sought to investigate the cellular mechanism by which P2X7 might affect tumor aggressiveness. We have previously shown that one of the possibilities of P2X7's role in altering glioblastomas' growth is to sensitize them to cell death induced by ATP present on the border of the tumor, since gliomas present a low degradation rate of ATP and indirect evidences show that ATP is elevated around glioma tumors [23-25]. Despite these evidences, it is not clear whether ATP reaches high enough levels to activate the channel to induce pore transition, required for cell death induction. Therefore we set out to evaluate ligand-independent functions of P2X7 by silencing its expression in a glioblastoma cell line that expresses a functional P2X7 receptor. GL261 glioblastoma cell line silenced by lentiviral transduction of a shRNA from the Mission RNAi library, specific for P2X7, reduced P2X7 protein expression levels to about 70% compared with the control cells transduced with a vector containing an RNAi against GFP (Fig. 2A). Adhesion of P2X7-knockdown (KD) cells was reduced in about 30% (Fig 2B) and this reduction was not affected by addition of P2X7 antagonist  $\alpha$ ATP to control and P2X7KD cells (data not shown) previously shown to block ATP-induced cell death [19], suggesting that receptor activity is not necessary for adhesion ability.

Figure 2

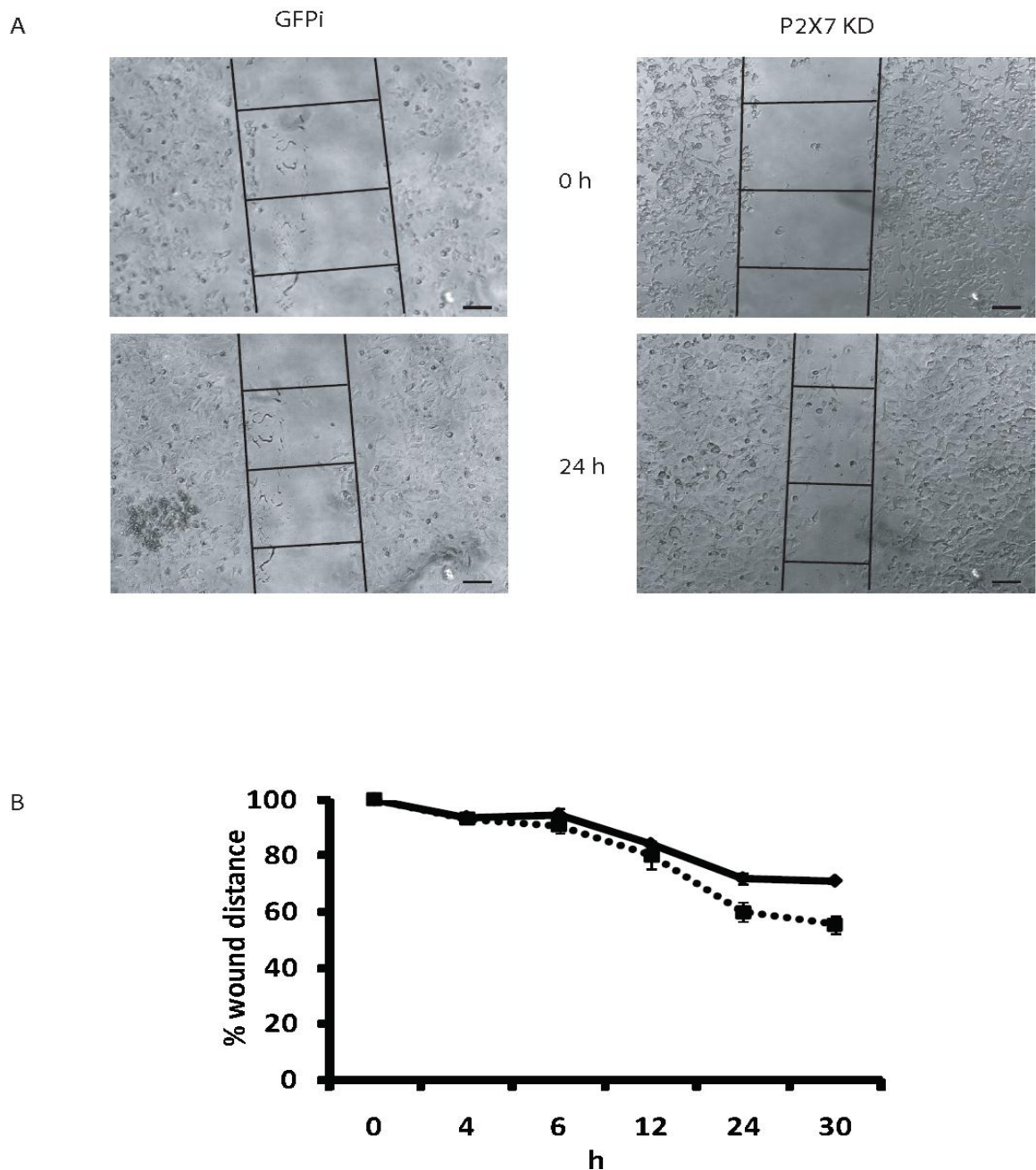


**Figure 2. P2X7 knockdown decreases cell adhesion.** Lentiviral transduction of a shRNA against P2X7 reduced P2X7 protein in GL261 (P2X7 KD) as analyzed by western blotting. shRNA against GFP was used as a control (GFPi) (A). Loading Control (LC) represents PVDF membrane stained with comassie blue. P2X7 KD (black bars) decreased the percentage of cells adhered during 90 minutes of incubation (average  $\pm$  SEM). \* $p < 0.05$ , T-test.

- ***P2X7 is involved in cell migration***

Alterations in the adhesion capacity of cells often lead to modifications in migration. P2X7 knockdown increased cell migration as observed in scratch wound assay (Fig. 3A). Thirty hours after the scratch, 43 % of the wound was covered with cells in P2X7 KD cultures against 30 % in control cultures (Fig. 3B). These data suggest that the presence of the P2X7 receptor has functions that go beyond the role as channel or pore.

Figure 3



**Figure 3. P2X7 silencing increases cellular migration.** Pictures of GL261 cultures were taken on inverted microscope and analysed by Image J software. Virtual lines were drawn on the edges line of the wound and 3 aleatorial distances were measured between the borders. P2X7 KD cells were faster in closing the scratch wound when compared to control cells (A). Bars represent 100  $\mu$ m. Quantification of this effect (average  $\pm$  SEM) of two independent experiments (B). Filled line corresponds to GFPi transduced cells and dotted line to P2X7 KD.



## Discussion

Glioma invasion is a multistep-process and is facilitated by tumor cell motility and degradation of extracellular matrix (ECM) barriers [26]. Cellular migration happens under non-homogeneous adhesion to its substrate. Therefore, an alteration in overall adhesion does not necessarily lead to alteration in migration. Although increased adhesion is usually related to increased migration [8], silencing of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in SNB19 human glioblastoma cell line inhibits tumor invasiveness by decreasing tumor migration and increasing cell adhesion to ECM molecules [27]. In squamous cell carcinoma SCC, a malignant skin tumor with potential to metastasize, the adhesion cell-cell molecule E-cadherin was reduced 3.1 fold in comparison with benign lesions, as keratoacanthomas. The diminished E-cadherin expression may indicate that the migratory potential of SCC cells could be enhanced by a reduction in cell-cell adhesion [15].

P2X7 protein, *per se*, is not considered an adhesion molecule and there are no evidences that it is directly involved in the adhesion process, but it can mediate the shedding of adhesion molecule L-selectin (CD62L) required by neutrophils and lymphocytes to adhere to endothelial cells [28]. It is important to note that P2X7 protein co-immunoprecipitates with molecules clearly involved in cell adhesion like integrins and laminins [29] and forms a functional signaling complex with these proteins. Since integrins are known to bind to various ECM molecules and mediate cell matrix interactions [8, 30], and laminins are one of the matrix components secreted by gliomas [30, 31], knockdown of P2X7 might destabilize or alter the localization of these proteins on the cell surface to ultimately affect adhesion and migration. It is important to stress out that pharmacological inhibition of the receptor had no influence on adhesion, reinforcing the dual role of P2X7 as an ATP receptor and a molecule involved in adhesion.

Reduced gap junction formation was shown to be correlated with increased *in vitro* glioma cell migration [32], as increased malignancy of gliomas is correlated with a reduction *in situ* of gap junction formation and connexin 43 expression [33]. Because the P2X7 protein seems to require association with pannexin to be functional [34], the knockdown of P2X7 could also decrease the availability of pannexin and, consequently, gap junction formation at the plasma membrane, stimulating cell migration. In accordance to this idea, stable expression of pannexin 1 in C6 cells increased gap junctional coupling and resulted in decreased cell

proliferation, cell motility, anchorage-independent growth and *in vivo* tumor growth [35].

In contrast to this result, activation of P2X7 by BzATP leads to an increased cell motility in rat C6 glioma, which can be antagonized by oATP [21]. This work also showed that P2X7 activation induces pore formation, without causing cell death. In the case of mouse GL261 glioma, P2X7 stimulation opens membrane pores and does cause cell death [19], demonstrating that the same mechanism in different animal species of gliomas can result in different responses.

Taken together, these results point to an anti-tumoral effect of P2X7 receptor, in humans, since its elevated expression is related to higher survival index and its downregulation confers more aggressive features to mouse glioma cells *in vitro*. Interestingly, although P2X7 expression in human gliomas samples did not correlate with malignant grade, within the low P2X7 expression group, 78% of the biopsies were grade IV glioblastomas against 44% of this kind of tumor in high P2X7-expressing samples. Reduced expression of P2X7 can reduce ATP toxic effects on gliomas and promote migration, which contributes for tumor progression, making the reduction in expression of this receptor a possible genetic alteration in the progression from less aggressive to more aggressive glioma tumors.

## Conclusions

Here, we demonstrated that P2X7 protein knockdown increases cellular migration and diminishes cellular adhesion *in vitro* in mouse GL261 cell line, what could be related to more aggressive tumors. Accordingly, upregulation of this purinergic receptor is associated to increased survival in patients with gliomas. Together with the evidences of the involvement of the purinergic system in gliomas tumor biology, this study provides new information about purinergic system influence in gliomagenesis.

## Conflict of Interest Statement

All authors have no conflicts of interest.

## **Role of the funding source**

Grant sponsors:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS); Grant number: 0410419;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Grant number: 473190/2004
- Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Grant number: 08-259

The sponsors had no involvement in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

## References

- [1] F. Cavaliere, S. Amadio, G. Sancesario, G. Bernardi, C. Volonte, Synaptic P2X7 and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures, *J Cereb Blood Flow Metab* 24 (2004) 392-398.
- [2] F.B. Morrone, A.P. Horn, J. Stella, F. Spiller, J.J. Sarkis, C.G. Salbego, G. Lenz, A.M. Battastini, Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity, *J Neurooncol* 71 (2005) 135-140.
- [3] C. Delarasse, P. Gonnord, M. Galante, R. Auger, H. Daniel, I. Motta, J.M. Kanellopoulos, Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor, *J Neurochem* 109 (2009) 846-857.
- [4] F.B. Morrone, M.C. Jacques-Silva, A.P. Horn, A. Bernardi, G. Schwartzmann, R. Rodnight, G. Lenz, Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines, *J Neurooncol* 64 (2003) 211-218.
- [5] T. Takenouchi, M. Nakai, Y. Iwamaru, S. Sugama, M. Tsukimoto, M. Fujita, J. Wei, A. Sekigawa, M. Sato, S. Kojima, H. Kitani, M. Hashimoto, The activation of P2X7 receptor impairs lysosomal functions and stimulates the release of autophagolysosomes in microglial cells, *J Immunol* 182 (2009) 2051-2062.
- [6] M. Monif, C.A. Reid, K.L. Powell, M.L. Smart, D.A. Williams, The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore, *J Neurosci* 29 (2009) 3781-3791.
- [7] N.G. Avgeropoulos, T.T. Batchelor, New treatment strategies for malignant gliomas, *Oncologist* 4 (1999) 209-224.
- [8] R.H. Goldbrunner, J.J. Bernstein, J.C. Tonn, Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion, *Acta Neurochir (Wien)* 141 (1999) 295-305; discussion 304-295.
- [9] G.M. D'Abaco, A.H. Kaye, Integrins: molecular determinants of glioma invasion, *J Clin Neurosci* 14 (2007) 1041-1048.
- [10] M. Slater, S. Danieletto, A. Gidley-Baird, L.C. Teh, J.A. Barden, Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors, *Histopathology* 44 (2004) 206-215.
- [11] M. Slater, S. Danieletto, M. Pooley, L. Cheng Teh, A. Gidley-Baird, J.A. Barden, Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions, *Breast Cancer Res Treat* 83 (2004) 1-10.

- [12] A. Solini, S. Cuccato, D. Ferrari, E. Santini, S. Gulinelli, M.G. Callegari, A. Dardano, P. Faviana, S. Madec, F. Di Virgilio, F. Monzani, Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease?, *Endocrinology* 149 (2008) 389-396.
- [13] B.M. Kunzli, P.O. Berberat, T. Giese, E. Csizmadia, E. Kaczmarek, C. Baker, I. Halaceli, M.W. Buchler, H. Friess, S.C. Robson, Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292 (2007) G223-230.
- [14] E. Adinolfi, L. Melchiorri, S. Falzoni, P. Chiozzi, A. Morelli, A. Tieghi, A. Cuneo, G. Castoldi, F. Di Virgilio, O.R. Baricordi, P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia, *Blood* 99 (2002) 706-708.
- [15] M. Slater, J.A. Barden, Differentiating keratoacanthoma from squamous cell carcinoma by the use of apoptotic and cell adhesion markers, *Histopathology* 47 (2005) 170-178.
- [16] X. Li, L. Zhou, Y.H. Feng, F.W. Abdul-Karim, G.I. Gorodeski, The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 (2006) 1906-1913.
- [17] N. White, P.E. Butler, G. Burnstock, Human melanomas express functional P2 X(7) receptors, *Cell Tissue Res* 321 (2005) 411-418.
- [18] R. Coutinho-Silva, L. Stahl, K.K. Cheung, N.E. de Campos, C. de Oliveira Souza, D.M. Ojcius, G. Burnstock, P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288 (2005) G1024-1035.
- [19] A.S. Tamajusuku, E.S. Villodre, R. Paulus, R. Coutinho-Silva, A.M. Battastini, M.R. Wink, G. Lenz, Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma, *J Cell Biochem* 109 (2010) 983-991.
- [20] L. Raffaghello, P. Chiozzi, S. Falzoni, F. Di Virgilio, V. Pistoia, The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism, *Cancer Res* 66 (2006) 907-914.
- [21] G.A. Weisman, B.K. De, I. Friedberg, R.S. Pritchard, L.A. Heppel, Cellular responses to external ATP which precede an increase in nucleotide permeability in transformed cells, *J Cell Physiol* 119 (1984) 211-219.

- [22] D.G. Flores, L. Meurer, A.F. Uberti, B.R. Macedo, G. Lenz, A.L. Brunetto, G. Schwartzmann, R. Roesler, Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain, *Brain Res Bull* (2010).
- [23] E. Braganhol, F.B. Morrone, A. Bernardi, D. Hupples, L. Meurer, M.I. Edelweiss, G. Lenz, M.R. Wink, S.C. Robson, A.M. Battastini, Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth, *Cancer Sci* 100 (2009) 1434-1442.
- [24] F.B. Morrone, D.L. Oliveira, P. Gamermann, J. Stella, S. Wofchuk, M.R. Wink, L. Meurer, M.I. Edelweiss, G. Lenz, A.M. Battastini, In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model, *BMC Cancer* 6 (2006) 226.
- [25] M.R. Wink, G. Lenz, E. Braganhol, A.S. Tamajusuku, G. Schwartzmann, J.J. Sarkis, A.M. Battastini, Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines, *Cancer Lett* 198 (2003) 211-218.
- [26] A. Giese, R. Bjerkvig, M.E. Berens, M. Westphal, Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment, *J Clin Oncol* 21 (2003) 1624-1636.
- [27] S. Mohanam, S.K. Chintala, Y. Go, A. Bhattacharya, B. Venkaiah, D. Boyd, Z.L. Gokaslan, R. Sawaya, J.S. Rao, In vitro inhibition of human glioblastoma cell line invasiveness by antisense uPA receptor, *Oncogene* 14 (1997) 1351-1359.
- [28] S. Sengstake, E.M. Boneberg, H. Illges, CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs, *Int Immunol* 18 (2006) 1171-1178.
- [29] M. Kim, L.H. Jiang, H.L. Wilson, R.A. North, A. Surprenant, Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex, *Embo J* 20 (2001) 6347-6358.
- [30] D.R. Friedlander, D. Zagzag, B. Shiff, H. Cohen, J.C. Allen, P.J. Kelly, M. Grumet, Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves alphaV and beta1 integrins, *Cancer Res* 56 (1996) 1939-1947.
- [31] S.A. Enam, M.L. Rosenblum, K. Edvardsen, Role of extracellular matrix in tumor invasion: migration of glioma cells along fibronectin-positive mesenchymal cell processes, *Neurosurgery* 42 (1998) 599-607; discussion 607-598.
- [32] W.S. McDonough, A. Johansson, H. Joffee, A. Giese, M.E. Berens, Gap junction intercellular communication in gliomas is inversely related to cell motility, *Int J Dev Neurosci* 17 (1999) 601-611.
- [33] L. Soroceanu, T.J. Manning, Jr., H. Sontheimer, Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas, *Glia* 33 (2001) 107-117.

- [34] P. Pelegrin, A. Surprenant, Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor, *Embo J* 25 (2006) 5071-5082.
- [35] C.P. Lai, J.F. Bechberger, R.J. Thompson, B.A. MacVicar, R. Bruzzone, C.C. Naus, Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells, *Cancer Res* 67 (2007) 1545-1554.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 GL261, uma linhagem de glioblastoma de camundongo sensível ao ATP extracelular

A primeira questão levantada pela resistência à morte induzida por ATP encontrada em glioblastomas de humano U138 e de rato C6 (Morrone et al., 2005) foi se a expressão do receptor citotóxico P2X7 estava diminuída nessas células. Surpreendentemente, embora as linhagens estudadas (U87, U138 e C6) não liberassem LDH frente às mais altas concentrações de ATP, a expressão do receptor P2X7 não se encontrava reduzida, pelo contrário, estava presente em todas as linhagens (capítulo 1, Fig. 5). A falta de funcionalidade do receptor P2X7, pelo menos no quesito formação de poro, pode dever-se a poliformismos e/ou mutações, principalmente, na extremidade C-terminal fazendo com que ocorra a perda da sua atividade e, conseqüentemente, das vias de sinalização envolvidas (Fuller et al., 2009; Gu et al., 2001; Smart et al., 2003). Ou ainda, esta ausência de atividade pode ser devido a mutações em outras partes da proteína que impeçam o seu tráfego para a membrana plasmática (Smart et al., 2003), mas não a sua detecção por *Western blot*. Outro ponto a ser considerado é que como a formação de poro requer proteínas acessórias para sua atividade, como a panexina (Pelegriin & Surprenant, 2006), a expressão dessas proteínas também pode estar deficiente nas linhagens de glioblastoma insensíveis ao ATP extracelular. Apesar de já ser relatada a presença de transcrito de panexina em algumas dessas linhagens de glioblastoma humano, a sua ausência na linhagem C6 de rato já foi estabelecida (Lai et al., 2007).

Mais inesperado ainda foi encontrar uma linhagem de glioblastoma de camundongo, GL261, suscetível ao ATP extracelular. Além da linhagem de glioblastoma GL261, culturas primárias de células de glioblastomas de pacientes também apresentaram sensibilidade ao ATP extracelular em concentrações na ordem de mM (dados não mostrados), demonstrando que a sensibilidade ao ATP não é um caso isolado dessa linhagem, muito menos uma regra. Ainda assim, essa característica parece ir contra o modelo purinérgico no crescimento de glioblastomas, na qual as células tumorais seriam resistentes ao ATP extracelular. Na procura por uma compreensão mais ampla do cenário purinérgico-patológico, foram ensaiadas as atividades de hidrólise dos nucleotídeos extracelular tanto na linhagem GL261 quanto em cultura primária de glioblastoma humano. Para nossa surpresa, nem a linhagem de camundongo nem a cultura primária de glioblastoma



humanos apresentaram aquela inversão de hidrólise de nucleotídeos (ATPase baixa e AMPase alta) publicada anteriormente (Wink et al., 2003). Ou seja, essas células mantiveram a capacidade de hidrolisar ATP e ADP e mantiveram a hidrólise de AMP baixa, o que permite postular que, talvez, para células que mantêm os níveis de ATP em concentrações moderadas não há necessidade de desenvolver resistência ao ATP, uma vez que raramente o ATP extracelular vai atingir níveis tão elevados em torno da massa tumoral.

#### **4.2 Caracterização farmacológica e molecular do receptor P2X7 na morte celular induzida por ATP em GL261**

Como todo sistema de sinalização, que necessita da interação de moléculas e receptores e que funciona de maneira extremamente coordenada, o sistema purinérgico dispõe de diferentes tipos de proteínas (receptores e enzimas de hidrólise), cuja combinação das expressões e concentrações na superfície da membrana plasmática determina as cascatas de sinalização ativadas e os efeitos fisiológicos. Portanto, a existência de 4 subtipos de receptores P1 e 15 subtipos P2, por exemplo, torna a investigação sobre qual receptor é o principal responsável pela morte induzida por ATP uma tarefa minuciosa. Assim que os receptores purinérgicos foram sendo descritos, por muito tempo, os estudos os diferenciaram através de seus comportamentos farmacológicos, a saber: tipos e concentrações de agonistas e antagonistas e condições químicas de concentração de sais e pH na qual a reação acontecia. Entretanto, a similaridade entre suas respostas e a falta de agonistas e antagonistas bem seletivos para cada receptor nunca proporcionaram tanta certeza de seu envolvimento como a técnica de silenciamento de proteínas utilizada na última década. O processo de RNA de interferência (RNAi) foi descoberto, primeiramente, em plantas como mecanismo de regulação protéica e logo foi observado em organismos animais, dando subsídios para o desenvolvimento de uma técnica em que os pesquisadores podem diminuir significativamente a produção de uma proteína sem deletá-la geneticamente (Lenz, 2005). Extensamente utilizada na varredura genômica de *C. elegans* (Ashrafi et al., 2003; Kamath et al., 2003), rapidamente a metodologia estendeu-se para estudos com células da espécie humana (Berns et al., 2004; Kiger et al., 2003).

Especialmente, no sistema purinérgico, o RNAi associado à farmacologia tem tido papel fundamental para confirmar a participação de receptores e enzimas nos efeitos fisiológicos já descritos. Durante este estudo, a abordagem farmacológica

permitiu afunilar as opções de envolvimento dos receptores purinérgicos. Além do ATP ser conhecido por mediar morte celular, também o ADP (Tan et al., 2010), UDP (Apolloni et al., 2010), metabólitos da hidrólise do ATP e do UTP, respectivamente, pelas nucleotidases, podem induzir apoptose. Inclusive a adenosina, que tem seu papel neuroprotetor bem descrito na literatura, pode ter seus efeitos deletérios (Jacobson et al., 1999; Sun, Khoo & Tan, 2005). Basicamente, após a constatação da falta de indução de morte celular com adenosina, ADP e UTP, em nossas células, foram descartados os receptores P1 e P2Y, que pela varredura realizada com RT-PCR, estavam amplamente expressos. Entre os receptores P2Xs expressos em GL261 (todos menos o subtipo 2, capítulo 1), o único receptor que também foi descrito mediar apoptose é o P2X4 (Solini et al., 2007), por isso, a ineficácia do TNP-ATP, antagonista de receptores P2X1-6, juntamente com o bloqueio do oATP, antagonista de P2X7 na morte induzida por ATP apontava o P2X7 como principal responsável desse efeito deletério.

Corroborando com esses dados, o experimento da expressão seletiva de P2X7 (capítulo 1) mostrou que as células que morriam primeiro eram as que apresentavam maior expressão do receptor. Esse experimento parte do pressuposto de que numa cultura celular, por mais que seja uma linhagem, as células expressam suas proteínas em diferentes quantidades; junto com a observação de que a morte celular induzida por ATP é um evento com uma dinâmica de tempo mensurável, foi possível separar essas duas populações: não-aderente (mais sensível ao ATP) e aderente (menos sensível ao ATP). Nestas duas populações, foram quantificadas, por RT-PCR, as expressões de todos os subtipos de receptores P2Xs e somente o P2X7 mostrou expressão diferenciada, correlacionando com a sensibilidade ao ATP extracelular. Esta abordagem, junto com os resultados farmacológicos, foi essencial para a escolha certa do gene alvo a ser silenciado na célula GL261, principalmente porque a transdução viral de plasmídeos contendo o RNAi é ainda uma técnica demorada e também custosa para os padrões nacionais de pesquisa, embora internacionalmente indispensável. Nesse trabalho, o estabelecimento da linhagem GL261 P2X7-*knockdown* (P2X7 KD) foi decisivo para a confirmação do envolvimento substancial deste receptor na morte induzida por ATP, uma vez que o efeito nocivo foi completamente abolido nessa nova linhagem. Embora a morte celular tenha diminuído drasticamente, a diminuição da abertura do poro ainda foi visível em uma certa proporção de células, o que permite pensar que esses dois eventos possam ser independentes. Experimentos bloqueadores da formação do poro, como por

exemplo, bloqueadores de conexina, que inibem também a panexina, poderiam ajudar a elucidar essa questão.

Apesar de as técnicas moleculares contribuírem eficazmente na investigação da sinalização purinérgica, devem estar sempre integradas com experimentos bioquímicos tradicionais, que são as medidas dos resultados finais da intervenção molecular. Recentemente, descobriu-se uma nova variante de processamento alternativo do receptor P2X7, denominada P2X7(k) que contém uma porção N-terminal e o primeiro domínio transmembrana alternativos, codificados pelo exon 1 (Nicke et al., 2009). Esta variante escapa da deleção do P2X7 no camundongo *knockout* distribuído pela companhia GlaxoSmithKline, o que explicaria como leucócitos derivados de camundongos *knockouts* para o P2X7 exibem respostas até aumentadas de P2X7 (Taylor et al., 2009), ou ainda as diferenças encontradas entre as duas linhagens de camundongos *knockouts* comerciais. Ou seja, mesmo que as modificações moleculares sejam específicas, é necessário que sejam acompanhadas das observações bioquímicas e biofísicas para uma avaliação mais aprofundada.

### **4.3 Tipo de morte celular induzida por ATP na GL261**

A intenção da caracterização molecular da morte induzida por ATP na linhagem GL261 foi a procura de mecanismos que pudessem tornar as outras linhagens de glioblastoma sensíveis ao ATP extracelular. Desde as primeiras descrições do receptor de ATP permeabilizador, as respostas desencadeadas estavam ligadas à morte celular, criando-se inclusive a denominação receptor citotóxico de ATP. Essa associação foi acompanhando a descoberta dos diferentes tipos de morte celular.

Primeiramente, foi descrita a habilidade do ATP causar apoptose em células de mastocitoma P-815 (Di Virgilio et al., 1989), células linfóides YAC (Di Virgilio et al., 1989) e timócitos de camundongos (Zheng, Zychlinsky & Liu, 1991). Nas linhagens celulares de microglia N9 e N13, pode-se observar a condensação nuclear e a fragmentação do DNA e a ativação das caspases 1,3 e 8 tendo como substratos a PARP e a laminina B (Sanz & Di Virgilio, 2000; Solini et al., 2008). Externalização de fosfatidilserina e *blebbing* de membrana são marcas clássicas de apoptose associadas também à ativação de P2X7 (MacKenzie et al., 2001). Por outro lado, neurônios dopaminérgicos SN 4741 apresentam características morfológicas de

morte necrótica via ativação de P2X7 tais como rápido inchaço, perda da integridade do retículo endoplasmático, formação de vacúolos citoplasmáticos e lise osmótica com liberação do conteúdo citoplasmático por rompimento de membrana (Jun et al., 2007). Mais recentemente, até a morte celular autofágica foi descrita como sendo mediada por ATP/P2X7 com expressão induzida de LC3-II e aparecimento de autofagossomos de membrana dupla, durante a defesa de monócitos derivados de macrófagos contra micobactérias (Biswas et al., 2008) No caso das células de microglia, a sinalização via P2X7 parece regular negativamente a autofagia (Takenouchi et al., 2009). Entretanto, em muitos casos, a célula pode apresentar características de mais de um tipo de morte celular ao mesmo tempo, demonstrando que as vias de sinalização podem estar integradas.

Na linhagem GL261, o tratamento com altas doses de ATP produz características celulares de necrose como liberação de LDH, falta de ativação de caspases e falta de exposição da fosfatidilserina. Ao mesmo tempo, a descrição da ocorrência de encolhimento celular, um distintivo de apoptose, parece indicar um outro mecanismo de ativação de necrose em GL261 ou uma mistura de eventos (capítulo 1). No trabalho de Tsukimoto e colaboradores (2005), a morte celular induzida por BzATP em linhagem celular de linfócitos B de galinha é mediada pela entrada de  $\text{Cl}^-$  e apresenta características semelhantes à morte induzida por ATP em GL261: encolhimento celular, entrada de brometo de etídio, liberação de LDH e inibição por  $\text{Mg}^{2+}$ . Por detectarem exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática e ativação de caspases, os autores concluíram tratar-se de morte por apoptose. Os mesmos autores, no ano seguinte, demonstraram que o receptor P2X7 medeia duas rotas de sinalização de morte celular, uma por encolhimento e dependente de  $\text{Cl}^-$  extracelular (apoptótica) e outra envolvendo a fosforilação de ERK 1/2 (necrótica). Esses dois tipos de sinalização são modulados durante a maturação de células T de murinos (Tsukimoto et al., 2006). Se as respostas desencadeadas pelo receptor P2X7 podem ser moduladas durante a maturação, significa que talvez ele possa ser modulado também durante a diferenciação ou ainda na gliomagênese. Células cancerígenas são consideradas células mais indiferenciadas, com características até de células-tronco, o que levanta a dúvida sobre a origem dos tumores gliais: progenitores neurais ou células gliais indiferenciadas. A linhagem GL261 é sensível ao ATP como as células progenitoras neurais (Delarasse et al., 2009), ao mesmo tempo em que não apresenta inversão nas hidrólises de nucleotídeos extracelulares como astrócitos ou neurônios (dados

não mostrados). Ou seja, mesmo considerando o sistema purinérgico, esta linhagem parece encontrar-se numa fase de transição na qual apresenta características próximas tanto de células progenitoras quanto de células diferenciadas, abrindo a possibilidade de co-existirem também essas duas vias de sinalização de morte induzidas por P2X7. Considerando ainda o sistema purinérgico, a linhagem de glioblastoma de rato C6, que apresenta a capacidade de hidrólise dos nucleotídeos invertida e resistência à morte induzida por ATP, é capaz de formar tumores em modelos animais (Morrone et al., 2006). Se for verdade que a linhagem GL261 ainda tenha características de células diferenciadas, é possível que a malignidade encontrada na linhagem GL261 seja menor que a da linhagem de rato C6, dificultando a técnica de implante de glioblastoma em cérebros de camundongos, testada sem sucesso nesse trabalho.

#### **4.4 P2X7 como uma proteína supressora tumoral**

Embora a avaliação *in vivo* do efeito do silenciamento do receptor P2X7 ainda não tenha sido possível realizar, a análise das poucas amostras obtidas de pacientes com glioblastomas demonstraram o mesmo perfil de correlação positiva entre a expressão de P2X7 e a sobrevida dos pacientes (capítulo 2) comparada com a correlação encontrada no banco de dados de amostras de glioblastomas, o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Utilizando diferentes plataformas de microarranjo, esse banco de dados reúne informações sobre a expressão de mRNA de milhares de genes em amostras de diversos tipos de câncer. Os pesquisadores desse projeto publicaram as principais alterações encontradas em tumores envolvendo genes das vias dos receptores tirosina quinase, da p53 e da retinoblastoma (McLendon R et al., 2008) e disponibilizaram as demais informações no portal do TCGA (<http://cancergenome.nih.gov/>), que são atualizados frequentemente. Dessa maneira, permite-se que pesquisadores do mundo todo tenham acesso a dados relevantes não só de glioblastomas humanos, mas de outros tipos de câncer, principalmente para aqueles que têm dificuldades na obtenção das amostras. De fato, o tamanho amostral do presente trabalho parece ser pequeno para se concluir que a alta expressão do receptor P2X7 correlaciona positivamente com a sobrevida dos pacientes. Apesar disso, como esta correlação é encontrada também nos dados do TCGA, o envolvimento do receptor P2X7 nesse tipo de tumor parece ser relevante.

Na busca por uma explicação para essa correlação, analisou-se o comportamento da linhagem de glioma GL261 de camundongo silenciada para o receptor P2X7. De acordo com os dados encontrados, a diminuição da proteína, por RNA de interferência, na linhagem GL261, levou a uma diminuição da adesão, mas um aumento na migração celular (capítulo 2). Como a infiltração das células de glioblastomas é uma das características que contribui para o mau prognóstico dos pacientes e depende desses processos celulares, geralmente a migração é um determinante na invasão tumoral (Giese et al., 2003). Por isso, são considerados tumores mais invasivos aqueles que apresentam maior capacidade de adesão à matriz extracelular (ECM), degradação de ECM e mobilidade. O deslocamento celular depende da distribuição polar das proteínas de adesão, ou seja, é necessário que a célula faça uma boa adesão em direção ao espaço criado, mas seja capaz também de desgrudar-se no pólo oposto para que ocorra o movimento. Embora as matrizes extracelulares não tenham sido estudadas, a diminuição da adesão das células GL261 silenciadas para P2X7 ao plástico das placas de cultura pode significar que, estando a célula mais livre, ela tenha maior capacidade de deslocamento, como foi visto no ensaio de migração. Mesmo que essa diferença na velocidade ainda pareça pequena em relação à célula controle (Figura 3 do capítulo 2), o aumento de velocidade associado com outras características como a resistência à morte por ATP das GL261 silenciadas para P2X7 (capítulo 1) garante uma boa vantagem em relação às células selvagens, principalmente ao considerar a invasão do tumor em direção do tecido sadio. De fato, visto que entre as amostras de pacientes, as de menor expressão de P2X7 tinham maior número de diagnósticos agressivos (grau IV) e que as amostras de cérebro normal tinham valores de expressão mais comparáveis com o grupo de maior expressão de P2X7, parece que a perda do receptor, tanto em nível protéico quanto de funcionalidade, confere vantagem evolutiva às células tumorais de glioblastoma. Ou seja, as células que, de alguma maneira, regulam negativamente o receptor P2X7 adquirem vantagens como a resistência à morte induzida por ATP, diminuição da adesão, aumento da migração e invasão tumoral, tornando-se glioblastomas com maior grau de malignidade, diminuindo assim a sobrevivência dos pacientes acometidos por essa doença. Por isso, estratégias de recuperação e/ou indução da expressão e funcionalidade do receptor P2X7, que induz morte celular em glioblastomas, merecem ser melhor investigadas, a fim de que esse receptor possa ser associado (ou descartado) na terapia gênica com outros genes anti-tumorais. Algumas tentativas de transfecção de um

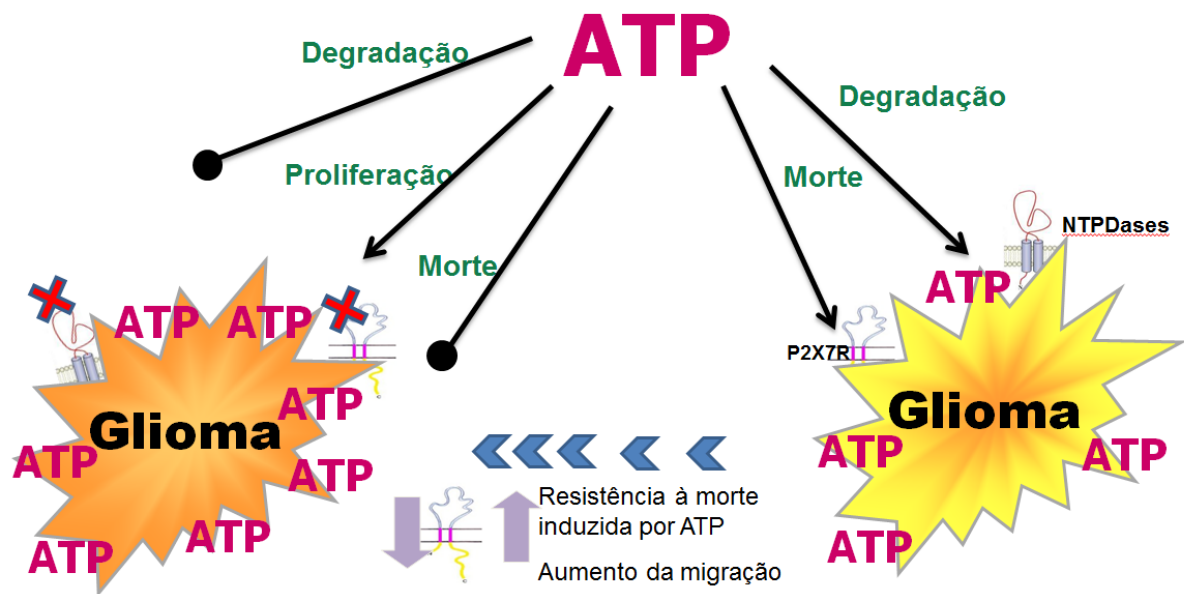
plasmídeo contendo o receptor P2X7 e a proteína fluorescente verde (GFP) em linhagens de glioblastomas insensíveis ao ATP foram feitas neste trabalho, entretanto, apesar de as células emitirem fluorescência, as mesmas não apresentaram abertura de poro com a indução de ATP. As hipóteses levantadas para a falta de efeito do ligante nas células de glioma foram: 1) erro de clonagem, na qual possa ter ocorrido uma mutação importante principalmente na extremidade C-terminal, ou ainda, em algum ponto em que prejudique o tráfego da proteína para a membrana; ou 2) por apresentarem expressão de P2X7 não-funcional, as moléculas defeituosas das células selvagens podem ter heteromerizado com as moléculas transfectadas, impedindo sua funcionalidade como ocorre com a variante de processamento alternativo (P2X7-j), cujas subunidades quando complexadas com as subunidades normais interfere negativamente na funcionalidade do receptor formado (Feng et al., 2006). Além disso, a transfecção em células de glioma é ainda pouco eficiente, dificultando a obtenção de um bom número de células transfectadas para nossas análises. Nesse caso, o estabelecimento de uma linhagem de glioma que expressa estavelmente o receptor P2X7 seria uma ferramenta útil e mais eficaz para esta avaliação.

#### **4.5 P2X7 no modelo purinérgico para o envolvimento do ATP extracelular no crescimento tumoral**

Por fim, os dados apresentados sobre a expressão e a funcionalidade do receptor P2X7 neste trabalho, em conjunto com as referências anteriores, permitem elaborar uma hipótese que contribui para o modelo purinérgico para o envolvimento do ATP extracelular na progressão tumoral. Na figura 10, tem-se o efeito do ATP extracelular, liberado tanto por injúria ao tecido sadio como pelo próprio glioblastoma (Bennett & Boarder, 2000; Queiroz et al., 1999; Pellegatti et al., 2008), em dois tipos de glioblastomas. Na célula tumoral que apresenta atividades das NTPDases e do receptor purinérgico P2X7 (glioblastoma à direita), o ATP extracelular é degradado enzimaticamente e não acumula ao redor do glioblastoma de maneira suficiente para desencadear seus efeitos deletérios via receptor P2X7. Portanto, mesmo que a célula seja sensível à morte induzida por ATP, ela protege-se pela degradação do nucleotídeo pelas NTPDases presentes. Já os glioblastomas à esquerda acumulam ATP na sua superfície, pois perderam suas atividades das NTPDases, entretanto não morrem por falta de funcionalidade do receptor P2X7, o que confere resistência

à morte induzida pelo nucleotídeo. Ao contrário, podem se beneficiar do efeito proliferativo do ATP (Morrone et al., 2003).

Considerando que o silenciamento deste receptor em glioblastomas, leva a um aumento da resistência à morte induzida por ATP e um aumento na migração celular, características de maior malignidade tumoral, e ainda que pacientes cujos glioblastomas apresentam alta expressão do receptor P2X7 exibem maior sobrevida do que aqueles pacientes cujos glioblastomas apresentam baixa expressão de P2X7, é possível pensar que a perda da funcionalidade dessas proteínas purinérgicas seja um fator importante para a progressão da célula tumoral para estágios de maior agressividade. Ou seja, a modulação do sistema purinérgico, de forma combinada em termos de enzimas e receptores, pode constituir, junto com as alterações genéticas das vias de morte e ciclo celular, uma etapa essencial para a gliomagênese. Da mesma forma, estratégias terapêuticas que visem restaurar estas atividades do sistema purinérgico do glioblastoma poderão contribuir para o avanço nos tratamentos para esta enfermidade.



**Figura 10: Modelo proposto para o envolvimento do receptor P2X7 na progressão tumoral.**

Glioblastomas sensíveis à morte por ATP (à direita) via receptor P2X7 apresentam atividade NTPDásica e portanto degradam este nucleotídeo impedindo que o receptor seja ativado. Glioblastomas resistentes à morte por ATP (à esquerda) perderam a funcionalidade do receptor e também das enzimas nucleotidásicas. A diminuição da expressão do receptor P2X7 foi proposta como etapa importante da progressão tumoral uma vez que o silenciamento do P2X7 leva ao aumento da resistência à morte induzida por ATP e da migração celular.



## 5 CONCLUSÕES

### 5.1 GERAIS

1. A linhagem de glioblastoma de camundongo, GL261, é sensível à morte induzida por ATP extracelular, diferentemente de outras linhagens de glioblastoma U87 e U138 de humanos e C6 de rato.
2. A morte celular induzida por ATP em GL261 é mediada pelo receptor purinérgico P2X7 e apresenta mais características necróticas do que apoptóticas.
3. A maior expressão de P2X7 em amostras de glioblastomas humanos está diretamente correlacionada com a sobrevida dos pacientes.
4. O silenciamento de P2X7 induz uma diminuição na adesão e um aumento na migração na linhagem GL261.

### 5.2 ESPECÍFICAS

1. A linhagem de glioblastoma de camundongo GL261 é sensível à morte por ATP extracelular em concentrações acima de 2 mM.
2. A morte celular induzida por ATP em GL261 é dependente de concentração e de tempo, medida tanto pela liberação de LDH e viabilidade mitocondrial (MTT).
3. As células de GL261 expressam diversos receptores purinérgicos: A2a, P2X1, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7, P2Y2, P2Y6, P2Y12, e P2Y14.
4. Dentre os agonistas testados, somente o agonista purinérgico BzATP a partir de 1 mM foi capaz de causar morte celular, assim como somente o antagonista oATP inibiu a morte induzida por ATP.
5. Populações de células da linhagem GL261 que naturalmente expressam mais P2X7 em relação à população de células que naturalmente expressam menos P2X7 são mais suscetíveis à morte celular induzida por ATP.
6. O silenciamento de P2X7 diminuiu a formação de poro.
7. O silenciamento de P2X7 inibiu a morte celular induzida por ATP.

8. A presença de proteína P2X7 não é um requisito necessário para a resistência da morte celular induzida por ATP, uma vez que glioblastomas resistentes apresentam a proteína.
9. A morte celular induzida por ATP em GL261 não ativa caspases e não expõe sítios de fosfatidilserina, mas apresenta encolhimento celular.
10. Amostras de pacientes com glioblastomas com expressão aumentada de P2X7 mostraram uma tendência de maior sobrevida similar à correlação encontrada no banco de dados “The Cancer Genome Atlas”.
11. A diminuição da expressão de P2X7 leva à diminuição da adesão celular ao plástico e ao aumento da migração celular.

### **5.3 PERSPECTIVAS**

1. Investigar a sinalização de morte celular na linhagem GL261, principalmente a via da ERK 1/2.
2. Analisar a sequência gênica do P2X7 expresso nas linhagens de glioblastoma insensíveis ao ATP extracelular a fim de procurar mutações e/ou produtos de processamento alternativo no gene que tornem a proteína não funcional.
3. Analisar a localização da expressão da proteína P2X7 por imunocitoquímica para excluir defeitos de tráfego da proteína para a membrana plasmática nas linhagens de gliomas insensíveis ao ATP.
4. Super-expressar estavelmente a proteína P2X7 a fim de sensibilizar as linhagens resistentes à morte por ATP.
5. Verificar o crescimento e invasão tumoral da linhagem GL261 em cérebros de camundongos comparando com a linhagem silenciada para o P2X7.
6. Realizar experimentos de imunoprecipitação com anticorpo anti-P2X7 comparando linhagens sensíveis e insensíveis ao ATP na procura de moléculas acessórias necessárias para esse efeito deletério.
7. Analisar, por HPLC, a hidrólise de nucleotídeos extracelulares; por Western blot e RT-PCR, a expressão das enzimas responsáveis por essa hidrólise na linhagem GL261 selvagem (não-transduzido), GL261 GFPi e GL261-P2X7 silenciada, para melhor compreender a interação do tumor com o tecido sadio em vistas do sistema purinérgico.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- ADINOLFI, E., MELCHIORRI, L., FALZONI, S., CHIOZZI, P., MORELLI, A., TIEGHI, A., CUNEO, A., CASTOLDI, G., DI VIRGILIO, F. & BARICORDI, O. R. (2002). P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood* 99, 706-8.
- ADINOLFI, E., PIZZIRANI, C., IDZKO, M., PANTHER, E., NORGAUER, J., DI VIRGILIO, F. & FERRARI, D. (2005). P2X(7) receptor: Death or life? *Purinergic Signal* 1, 219-27.
- ADRIOUCH, S., DOX, C., WELGE, V., SEMAN, M., KOCH-NOLTE, F. & HAAG, F. (2002). Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol* 169, 4108-12.
- AMADIO, S., D'AMBROSI, N., CAVALIERE, F., MURRA, B., SANCESARIO, G., BERNARDI, G., BURNSTOCK, G. & VOLONTE, C. (2002). P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacology* 42, 489-501.
- ANDREANSKY, S., HE, B., VAN COTT, J., MCGHEE, J., MARKERT, J. M., GILLESPIE, G. Y., ROIZMAN, B. & WHITLEY, R. J. (1998). Treatment of intracranial gliomas in immunocompetent mice using herpes simplex viruses that express murine interleukins. *Gene Ther* 5, 121-30.
- APOLLONI, S., FINOCCHI, P., D'AGNANO, I., ALLOISIO, S., NOBILE, M., D'AMBROSI, N. & VOLONTE, C. (2010). UDP exerts cytostatic and cytotoxic actions in human neuroblastoma SH-SY5Y cells over-expressing P2Y6 receptor. *Neurochem Int* 56, 670-8.
- ASHRAFI, K., CHANG, F. Y., WATTS, J. L., FRASER, A. G., KAMATH, R. S., AHRINGER, J. & RUVKUN, G. (2003). Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 421, 268-72.
- AUSMAN, J. I., SHAPIRO, W. R. & RALL, D. P. (1970). Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: development of an experimental model. *Cancer Res* 30, 2394-400.
- AVGEROPOULOS, N. G. & BATCHELOR, T. T. (1999). New treatment strategies for malignant gliomas. *Oncologist* 4, 209-24.
- BALLERINI, P., RATHBONE, M. P., DI IORIO, P., RENZETTI, A., GIULIANI, P., D'ALIMONTE, I., TRUBIANI, O., CACIAGLI, F. & CICCARELLI, R. (1996). Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport* 7, 2533-7.
- BAVARESCO, L., BERNARDI, A., BRAGANHOL, E., CAPPELLARI, A. R., ROCKENBACH, L., FARIAS, P. F., WINK, M. R., DELGADO-CANEDO, A. & BATTASTINI, A. M. (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem* 319, 61-8.
- BEHRENS, P. F., LANGEMANN, H., STROHSCHNEIN, R., DRAEGER, J. & HENNIG, J. (2000). Extracellular glutamate and other metabolites in and around RG2 rat glioma: an intracerebral microdialysis study. *J Neurooncol* 47, 11-22.
- BENNETT, G. C. & BOARDER, M. R. (2000). The effect of nucleotides and adenosine on stimulus-evoked glutamate release from rat brain cortical slices. *Br J Pharmacol* 131, 617-23.
- BERNS, K., HIJMANS, E. M., MULLENDERS, J., BRUMMELKAMP, T. R., VELDS, A., HEIMERIKX, M., KERKHOVEN, R. M., MADIREDO, M., NIJKAMP, W., WEIGELT, B., AGAMI, R., GE, W., CAVET, G., LINSLEY, P. S., BEIJERSBERGEN, R. L. & BERNARDS, R. (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 428, 431-7.

- BERNSTEIN, J. J. & WOODARD, C. A. (1995). Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *Neurosurgery* 36, 124-32; discussion 132.
- BERNSTEIN, L. J., TONN, J. C., GOLDBRUNNER, R. H., VINCE, G. H., WAGNER, S. & GOLDBERG, W. J. (1998). Guanidinobenzoate and UPA in high-grade human astrocytomas and after xenografting cell suspensions into the rat cerebral cortex: proteases for metastasis and disease progression. *Anticancer Res* 18, 2583-90.
- BIANCHI, B. R., LYNCH, K. J., TOUMA, E., NIFORATOS, W., BURGARD, E. C., ALEXANDER, K. M., PARK, H. S., YU, H., METZGER, R., KOWALUK, E., JARVIS, M. F. & VAN BIESEN, T. (1999). Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 376, 127-38.
- BIANCO, F., PRAVETTONI, E., COLOMBO, A., SCHENK, U., MOLLER, T., MATTEOLI, M. & VERDERIO, C. (2005). Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol* 174, 7268-77.
- BISWAS, D., QURESHI, O. S., LEE, W. Y., CROUDACE, J. E., MURA, M. & LAMMAS, D. A. (2008). ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunol* 9, 35.
- BOGLER, O., NAGANE, M., GILLIS, J., HUANG, H. J. & CAVENEE, W. K. (1999). Malignant transformation of p53-deficient astrocytes is modulated by environmental cues in vitro. *Cell Growth Differ* 10, 73-86.
- BOUÉ-GRABOT, E., ARCHAMBAULT, V. & SÉGUÉLA, P. (2000). A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X2 ATP-gated channels. *J Biol Chem* 275, 10190-5.
- BRAGANHOL, E., MORRONE, F. B., BERNARDI, A., HUPPES, D., MEURER, L., EDELWEISS, M. I., LENZ, G., WINK, M. R., ROBSON, S. C. & BATTASTINI, A. M. (2009). Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. *Cancer Sci* 100, 1434-42.
- BRANDLE, U., KOHLER, K. & WHEELER-SCHILLING, T. H. (1998). Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Brain Res Mol Brain Res* 62, 106-9.
- BURNSTOCK, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24, 509-81.
- BURNSTOCK, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87, 659-797.
- BURNSTOCK, G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7, 575-90.
- BUSCHGES, R., WEBER, R. G., ACTOR, B., LICHTER, P., COLLINS, V. P. & REIFENBERGER, G. (1999). Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol* 9, 435-42; discussion 432-3.
- CABRINI, G., FALZONI, S., FORCHAP, S. L., PELLEGATTI, P., BALBONI, A., AGOSTINI, P., CUNEO, A., CASTOLDI, G., BARICORDI, O. R. & DI VIRGILIO, F. (2005). A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. *J Immunol* 175, 82-9.
- CANTU, M. D., CARRILO, E., WULFF, N. A. & PALMA, M. S. (2008). Peptide sequencing using mass spectrometry: a practical guide. *Quim Nova* 31, 669-675.
- CHEEWATRAKOOLPONG, B., GILCREST, H., ANTHES, J. C. & GREENFEDER, S. (2005). Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 17-27.
- CHEN, Y. W., DONNELLY-ROBERTS, D. L., NAMOVIC, M. T., GINTANT, G. A., COX, B. F., JARVIS, M. F. & HARRIS, R. R. (2005). Pharmacological characterization of P2X7 receptors in rat peritoneal cells. *Inflamm Res* 54, 119-26.

- CHICOINE, M. R. & SILBERGELD, D. L. (1995). Assessment of brain tumor cell motility in vivo and in vitro. *J Neurosurg* 82, 615-22.
- COCKCROFT, S. & GOMPERTS, B. D. (1979). Activation and inhibition of calcium-dependent histamine secretion by ATP ions applied to rat mast cells. *J Physiol* 296, 229-43.
- COCKCROFT, S. & GOMPERTS, B. D. (1980). The ATP<sub>4</sub>- receptor of rat mast cells. *Biochem J* 188, 789-98.
- COLOMAR, A. & AMEDEE, T. (2001). ATP stimulation of P2X(7) receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells. *Eur J Neurosci* 14, 927-36.
- COSTELLO, J. F., PLASS, C., ARAP, W., CHAPMAN, V. M., HELD, W. A., BERGER, M. S., SU HUANG, H. J. & CAVENEE, W. K. (1997). Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res* 57, 1250-4.
- COUTINHO-SILVA, R., STAHL, L., CHEUNG, K. K., DE CAMPOS, N. E., DE OLIVEIRA SOUZA, C., OJCIUS, D. M. & BURNSTOCK, G. (2005). P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G1024-35.
- D'ABACO, G. M. & KAYE, A. H. (2007). Integrins: molecular determinants of glioma invasion. *J Clin Neurosci* 14, 1041-8.
- DAI, C. & HOLLAND, E. C. (2001). Glioma models. *Biochim Biophys Acta* 1551, M19-27.
- DELARASSE, C., GONNORD, P., GALANTE, M., AUGER, R., DANIEL, H., MOTTA, I. & KANELLOPOULOS, J. M. (2009). Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J Neurochem* 109, 846-57.
- DENLINGER, L. C., FISETTE, P. L., SOMMER, J. A., WATTERS, J. J., PRABHU, U., DUBYAK, G. R., PROCTOR, R. A. & BERTICS, P. J. (2001). Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 167, 1871-6.
- DENLINGER, L. C., SOMMER, J. A., PARKER, K., GUDIPATY, L., FISETTE, P. L., WATTERS, J. W., PROCTOR, R. A., DUBYAK, G. R. & BERTICS, P. J. (2003). Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X7 nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function. *J Immunol* 171, 1304-11.
- DEUCHARS, S. A., ATKINSON, L., BROOKE, R. E., MUSA, H., MILLIGAN, C. J., BATTEN, T. F., BUCKLEY, N. J., PARSON, S. H. & DEUCHARS, J. (2001). Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 21, 7143-52.
- DI VIRGILIO, F. (1995). The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* 16, 524-8.
- DI VIRGILIO, F., BRONTE, V., COLLAVO, D. & ZANOVELLO, P. (1989). Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. *J Immunol* 143, 1955-60.
- DI VIRGILIO, F., SANZ, J. M., CHIOZZI, P. & FALZONI, S. (1999). The P2Z/P2X7 receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor. *Prog Brain Res* 120, 355-68.
- DONNELLY-ROBERTS, D. L., NAMOVIC, M. T., HAN, P. & JARVIS, M. F. (2009). Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br J Pharmacol* 157, 1203-14.

- DUAN, S., ANDERSON, C. M., KEUNG, E. C., CHEN, Y., CHEN, Y. & SWANSON, R. A. (2003). P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 23, 1320-8.
- EICKHORST, A. N., BERSON, A., COCKAYNE, D., LESTER, H. A. & KHAKH, B. S. (2002). Control of P2X2 channel permeability by the cytosolic domain. *J Gen Physiol* 120, 119-31.
- ENNION, S. J. & EVANS, R. J. (2002). Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol* 61, 303-11.
- FENG, Y. H., LI, X., WANG, L., ZHOU, L. & GORODESKI, G. I. (2006). A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem* 281, 17228-37.
- FERNANDO, S. L., SAUNDERS, B. M., SLUYTER, R., SKARRATT, K. K., GOLDBERG, H., MARKS, G. B., WILEY, J. S. & BRITTON, W. J. (2007). A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 360-6.
- FERRARI, D., VILLALBA, M., CHIOZZI, P., FALZONI, S., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. & DI VIRGILIO, F. (1996). Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J Immunol* 156, 1531-9.
- FREDERICK, L., WANG, X. Y., ELEY, G. & JAMES, C. D. (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 60, 1383-7.
- FREDHOLM, B. B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 14, 1315-23.
- FREIST, W., VERHEY, J. F., STUHMER, W. & GAUSS, D. H. (1998). ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett* 434, 61-5.
- FUJIWARA, Y. & KUBO, Y. (2004). Density-dependent changes of the pore properties of the P2X2 receptor channel. *J Physiol* 558, 31-43.
- FULCI, G., LABUHN, M., MAIER, D., LACHAT, Y., HAUSMANN, O., HEGI, M. E., JANZER, R. C., MERLO, A. & VAN MEIR, E. G. (2000). p53 gene mutation and ink4a-arf deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma. *Oncogene* 19, 3816-22.
- FULLER, S. J., STOKES, L., SKARRATT, K. K., GU, B. J. & WILEY, J. S. (2009). Genetics of the P2X7 receptor and human disease. *Purinergic Signal* 5, 257-62.
- GIESE, A., BJERKVIG, R., BERENS, M. E. & WESTPHAL, M. (2003). Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 21, 1624-36.
- GIESE, A., RIEF, M. D., LOO, M. A. & BERENS, M. E. (1994). Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Res* 54, 3897-904.
- GIESE, A. & WESTPHAL, M. (1996). Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 39, 235-50; discussion 250-2.
- GOLDBRUNNER, R. H., BERNSTEIN, J. J. & TONN, J. C. (1999). Cell-extracellular matrix interaction in glioma invasion. *Acta Neurochir (Wien)* 141, 295-305; discussion 304-5.
- GORDON, J. L. (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233, 309-19.
- GU, B. J., SLUYTER, R., SKARRATT, K. K., SHEMON, A. N., DAO-UNG, L. P., FULLER, S. J., BARDEN, J. A., CLARKE, A. L., PETROU, S. & WILEY, J. S. (2004). An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem* 279, 31287-95.

- GU, B. J., ZHANG, W., WORTHINGTON, R. A., SLUYTER, R., DAO-UNG, P., PETROU, S., BARDEN, J. A. & WILEY, J. S. (2001). A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem* 276, 11135-42.
- HIDE, I., TANAKA, M., INOUE, A., NAKAJIMA, K., KOHSAKA, S., INOUE, K. & NAKATA, Y. (2000). Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem* 75, 965-72.
- HOLLAND, E. C. (2001). Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* 2, 120-9.
- HOLTON, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145, 494-504.
- JACOBSON, K. A., HOFFMANN, C., CATTABENI, F. & ABBRACCHIO, M. P. (1999). Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling. *Apoptosis* 4, 197-211.
- JIANG, L. H., RASSENDREN, F., SURPRENANT, A. & NORTH, R. A. (2000). Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem* 275, 34190-6.
- JOHANSSON, F. K., GORANSSON, H. & WESTERMARK, B. (2005). Expression analysis of genes involved in brain tumor progression driven by retroviral insertional mutagenesis in mice. *Oncogene* 24, 3896-905.
- JUN, D. J., KIM, J., JUNG, S. Y., SONG, R., NOH, J. H., PARK, Y. S., RYU, S. H., KIM, J. H., KONG, Y. Y., CHUNG, J. M. & KIM, K. T. (2007). Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. *J Biol Chem* 282, 37350-8.
- KAMATH, R. S., FRASER, A. G., DONG, Y., POULIN, G., DURBIN, R., GOTTA, M., KANAPIN, A., LE BOT, N., MORENO, S., SOHRMANN, M., WELCHMAN, D. P., ZIPPERLEN, P. & AHRINGER, J. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421, 231-7.
- KHAKH, B. S., BAO, X. R., LABARCA, C. & LESTER, H. A. (1999). Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci* 2 (4), 322-9.
- KIGER, A. A., BAUM, B., JONES, S., JONES, M. R., COULSON, A., ECHEVERRI, C. & PERRIMON, N. (2003). A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J Biol* 2, 27.
- KIM, M., JIANG, L. H., WILSON, H. L., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *Embo J* 20, 6347-58.
- KLAPPERSTUCK, M., BUTTNER, C., SCHMALZING, G. & MARKWARDT, F. (2001). Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X(7) receptor. *J Physiol* 534, 25-35.
- KUCHER, B. M. & NEARY, J. T. (2005). Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes. *J Neurochem* 92, 525-35.
- KUKLEY, M., BARDEN, J. A., STEINHAUSER, C. & JABS, R. (2001). Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 36, 11-21.
- KUNZLI, B. M., BERBERAT, P. O., GIESE, T., CSIZMADIA, E., KACZMAREK, E., BAKER, C., HALACELI, I., BUCHLER, M. W., FRIESS, H. & ROBSON, S. C. (2007). Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G223-30.
- LAI, C. P., BECHBERGER, J. F., THOMPSON, R. J., MACVICAR, B. A., BRUZZONE, R. & NAUS, C. C. (2007). Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells. *Cancer Res* 67, 1545-54.

- LE STUNFF, H., AUGER, R., KANELLOPOULOS, J. & RAYMOND, M. N. (2004). The Pro-451 to Leu polymorphism within the C-terminal tail of P2X7 receptor impairs cell death but not phospholipase D activation in murine thymocytes. *J Biol Chem* 279, 16918-26.
- LENZ, G. (2005). The RNA interference revolution. *Braz J Med Biol Res* 38, 1749-57.
- LI, X., ZHOU, L., FENG, Y. H., ABDUL-KARIM, F. W. & GORODESKI, G. I. (2006). The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 1906-13.
- LOUIS, D. N., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., CAVENEE, W. K., BURGER, P. C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B. W. & KLEIHUES, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.
- LUCAE, S., SALYAKINA, D., BARDEN, N., HARVEY, M., GAGNE, B., LABBE, M., BINDER, E. B., UHR, M., PAEZ-PEREDA, M., SILLABER, I., ISING, M., BRUCKL, T., LIEB, R., HOLSBOER, F. & MULLER-MYHSOK, B. (2006). P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet* 15, 2438-45.
- LUMNICZKY, K., DESAKNAI, S., MANGEL, L., SZENDE, B., HAMADA, H., HIDVEGI, E. J. & SAFRANY, G. (2002). Local tumor irradiation augments the antitumor effect of cytokine-producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer Gene Ther* 9, 44-52.
- MACKENZIE, A., WILSON, H. L., KISS-TOTH, E., DOWER, S. K., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15, 825-35.
- MCLENDON R, FRIEDMAN A, BIGNER D, VAN MEIR EG, BRAT DJ, MASTROGIANAKIS GM, OLSON JJ, MIKKELSEN T, LEHMAN N, ALDAPE K, et al. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-8.
- MORRONE, F. B., HORN, A. P., STELLA, J., SPILLER, F., SARKIS, J. J., SALBEGO, C. G., LENZ, G. & BATTASTINI, A. M. (2005). Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurooncol* 71, 135-40.
- MORRONE, F. B., JACQUES-SILVA, M. C., HORN, A. P., BERNARDI, A., SCHWARTSMANN, G., RODNIGHT, R. & LENZ, G. (2003). Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurooncol* 64, 211-8.
- MORRONE, F. B., OLIVEIRA, D. L., GAMERMANN, P., STELLA, J., WOFCHUK, S., WINK, M. R., MEURER, L., EDELWEISS, M. I., LENZ, G. & BATTASTINI, A. M. (2006). In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer* 6, 226.
- MURGIA, M., HANAU, S., PIZZO, P., RIPPA, M. & DI VIRGILIO, F. (1993). Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J Biol Chem* 268, 8199-203.
- NATSUME, A., MIZUNO, M., RYUKE, Y. & YOSHIDA, J. (1999). Antitumor effect and cellular immunity activation by murine interferon-beta gene transfer against intracerebral glioma in mouse. *Gene Ther* 6, 1626-33.
- NEARY, J. T., KANG, Y. & SHI, Y. F. (2005). Cell cycle regulation of astrocytes by extracellular nucleotides and fibroblast growth factor-2. *Purinergic Signal* 1, 329-36.
- NEWBOLT, A., STOOP, R., VIRGINIO, C., SURPRENANT, A., NORTH, R. A., BUELL, G. & RASSENDREN, F. (1998). Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273, 15177-82.



- NEWCOMB, E. W., ALONSO, M., SUNG, T. & MILLER, D. C. (2000). Incidence of p14ARF gene deletion in high-grade adult and pediatric astrocytomas. *Hum Pathol* 31, 115-9.
- NICKE, A., KUAN, Y. H., MASIN, M., RETTINGER, J., MARQUEZ-KLAKA, B., BENDER, O., GORECKI, D. C., MURRELL-LAGNADO, R. D. & SOTO, F. (2009). A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem* 284, 25813-22.
- NINO-MORENO, P., PORTALES-PEREZ, D., HERNANDEZ-CASTRO, B., PORTALES-CERVANTES, L., FLORES-MERAZ, V., BARANDA, L., GOMEZ-GOMEZ, A., ACUNA-ALONZO, V., GRANADOS, J. & GONZALEZ-AMARO, R. (2007). P2X7 and NRAMP1/SLC11 A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 148, 469-77.
- OHLENDORFF, S. D., TOFTENG, C. L., JENSEN, J. E., PETERSEN, S., CIVITELLI, R., FENGER, M., ABRAHAMSEN, B., HERMANN, A. P., EIKEN, P. & JORGENSEN, N. R. (2007). Single nucleotide polymorphisms in the P2X7 gene are associated to fracture risk and to effect of estrogen treatment. *Pharmacogenet Genomics* 17, 555-67.
- PANENKA, W., JIJON, H., HERX, L. M., ARMSTRONG, J. N., FEIGHAN, D., WEI, T., YONG, V. W., RANSOHOFF, R. M. & MACVICAR, B. A. (2001). P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 21, 7135-42.
- PANNICKE, T., FISCHER, W., BIEDERMANN, B., SCHADLICH, H., GROSCHKE, J., FAUDE, F., WIEDEMANN, P., ALLGAIER, C., ILLES, P., BURNSTOCK, G. & REICHENBACH, A. (2000). P2X7 receptors in Muller glial cells from the human retina. *J Neurosci* 20, 5965-72.
- PELEGRIN, P. & SURPRENANT, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J* 25, 5071-82.
- PELLEGGATTI, P., RAFFAGHELLO, L., BIANCHI, G., PICCARDI, F., PISTOIA, V. & DI VIRGILIO, F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* 3, e2599.
- PERREGAUX, D. G. & GABEL, C. A. (1998). Post-translational processing of murine IL-1: evidence that ATP-induced release of IL-1 alpha and IL-1 beta occurs via a similar mechanism. *J Immunol* 160, 2469-77.
- PILKINGTON, C. J. (1996). The role of the extracellular matrix in neoplastic glial invasion of the nervous system. *Braz J Med Biol Res* 29, 1159-72.
- QUEIROZ, G., MEYER, D. K., MEYER, A., STARKE, K. & VON KUGELGEN, I. (1999). A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors. *Neuroscience* 91, 1171-81.
- RAFFAGHELLO, L., CHIOZZI, P., FALZONI, S., DI VIRGILIO, F. & PISTOIA, V. (2006). The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res* 66, 907-14.
- RAITHATHA, S. A., MUZIK, H., MUZIK, H., REWCASTLE, N. B., JOHNSTON, R. N., EDWARDS, D. R. & FORSYTH, P. A. (2000). Localization of gelatinase-A and gelatinase-B mRNA and protein in human gliomas. *Neuro Oncol* 2, 145-50.
- RALEVIC, V. & BURNSTOCK, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50, 413-92.
- RASSENDREN, F., BUELL, G. N., VIRGINIO, C., COLLO, G., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. (1997). The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* 272, 5482-6.

- REIFENBERGER, G., LIU, L., ICHIMURA, K., SCHMIDT, E. E. & COLLINS, V. P. (1993). Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 53, 2736-9.
- ROLLBROCKER, B., WAHA, A., LOUIS, D. N., WIESTLER, O. D. & VON DEIMLING, A. (1996). Amplification of the cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) gene is associated with high cdk4 protein levels in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 92, 70-4.
- ROZENGURT, E. & HEPPEL, L. A. (1975). A Specific effect of external ATP on the permeability of transformed 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 67, 1581-8.
- SANAI, N., ALVAREZ-BUYLLA, A. & BERGER, M. S. (2005). Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 353, 811-22.
- SANO, T., LIN, H., CHEN, X., LANGFORD, L. A., KOUL, D., BONDY, M. L., HESS, K. R., MYERS, J. N., HONG, Y. K., YUNG, W. K. & STECK, P. A. (1999). Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res* 59, 1820-4.
- SANZ, J. M. & DI VIRGILIO, F. (2000). Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol* 164, 4893-8.
- SELIGMAN, A. M. & SHEAR, M. D. (1939). Studies in carcinogenesis. VIII. Experimental production of brain tumors in mice with methylcholanthrene. *Am J Cancer* 37, 364-395.
- SHIRAISHI, T. & TABUCHI, K. (2003). Genetic alterations of human brain tumors as molecular prognostic factors. *Neuropathology* 23, 95-108.
- SILBERGELD, D. L. & CHICOINE, M. R. (1997). Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain. *J Neurosurg* 86, 525-31.
- SINGH, S. K., HAWKINS, C., CLARKE, I. D., SQUIRE, J. A., BAYANI, J., HIDE, T., HENKELMAN, R. M., CUSIMANO, M. D. & DIRKS, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- SLATER, M. & BARDEN, J. A. (2005). Differentiating keratoacanthoma from squamous cell carcinoma by the use of apoptotic and cell adhesion markers. *Histopathology* 47, 170-8.
- SLATER, M., DANIELETTO, S., GIDLEY-BAIRD, A., TEH, L. C. & BARDEN, J. A. (2004a). Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology* 44, 206-15.
- SLATER, M., DANIELETTO, S., POOLEY, M., CHENG TEH, L., GIDLEY-BAIRD, A. & BARDEN, J. A. (2004b). Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* 83, 1-10.
- SMART, M. L., GU, B., PANCHAL, R. G., WILEY, J., CROMER, B., WILLIAMS, D. A. & PETROU, S. (2003). P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem* 278, 8853-60.
- SMART, M. L., PANCHAL, R. G., BOWSER, D. N., WILLIAMS, D. A. & PETROU, S. (2002). Pore formation is not associated with macroscopic redistribution of P2X7 receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C77-84.
- SMITH, J. S., WANG, X. Y., QIAN, J., HOSEK, S. M., SCHEITHAUER, B. W., JENKINS, R. B. & JAMES, C. D. (2000). Amplification of the platelet-derived growth factor receptor-A (PDGFRA) gene occurs in oligodendrogliomas with grade IV anaplastic features. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 495-503.
- SOLINI, A., CUCCATO, S., FERRARI, D., SANTINI, E., GULINELLI, S., CALLEGARI, M. G., DARDANO, A., FAVIANA, P., MADEC, S., DI VIRGILIO, F. & MONZANI, F. (2008).

- Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease? *Endocrinology* 149, 389-96.
- SOLINI, A., SANTINI, E., CHIMENTI, D., CHIOZZI, P., PRATESI, F., CUCCATO, S., FALZONI, S., LUPI, R., FERRANNINI, E., PUGLIESE, G. & DI VIRGILIO, F. (2007). Multiple P2X receptors are involved in the modulation of apoptosis in human mesangial cells: evidence for a role of P2X4. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F1537-47.
- SPERLAGH, B., KOFALVI, A., DEUCHARS, J., ATKINSON, L., MILLIGAN, C. J., BUCKLEY, N. J. & VIZI, E. S. (2002). Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J Neurochem* 81, 1196-211.
- STEINBERG, T. H., NEWMAN, A. S., SWANSON, J. A. & SILVERSTEIN, S. C. (1987). ATP4-permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem* 262, 8884-8.
- SUADICANI, S. O., BROSNAN, C. F. & SCEMES, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Neurosci* 26, 1378-85.
- SUN, W., KHOO, H. E. & TAN, C. H. (2005). Adenosine induced apoptosis in BHK cells via P1 receptors and equilibrative nucleoside transporters. *J Biochem Mol Biol* 38, 314-9.
- SURPRENANT, A., RASSENDREN, F., KAWASHIMA, E., NORTH, R. A. & BUELL, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735-8.
- SZATMARI, T., LUMNICZKY, K., DESAKNAI, S., TRAJCEVSKI, S., HIDVEGI, E. J., HAMADA, H. & SAFRANY, G. (2006). Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci* 97, 546-53.
- TAKAHASHI, J. A., MORI, H., FUKUMOTO, M., IGARASHI, K., JAYE, M., ODA, Y., KIKUCHI, H. & HATANAKA, M. (1990). Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5710-4.
- TAKENOUCHE, T., NAKAI, M., IWAMARU, Y., SUGAMA, S., TSUKIMOTO, M., FUJITA, M., WEI, J., SEKIGAWA, A., SATO, M., KOJIMA, S., KITANI, H. & HASHIMOTO, M. (2009). The activation of P2X7 receptor impairs lysosomal functions and stimulates the release of autophagolysosomes in microglial cells. *J Immunol* 182, 2051-62.
- TAN, C., SALEHI, A., SVENSSON, S., OLDE, B. & ERLINGE, D. (2010). ADP receptor P2Y(13) induce apoptosis in pancreatic beta-cells. *Cell Mol Life Sci* 67, 445-53.
- TAYLOR, S. R., GONZALEZ-BEGNE, M., SOJKA, D. K., RICHARDSON, J. C., SHEARDOWN, S. A., HARRISON, S. M., PUSEY, C. D., TAM, F. W. & ELLIOTT, J. I. (2009). Lymphocytes from P2X7-deficient mice exhibit enhanced P2X7 responses. *J Leukoc Biol* 85, 978-86.
- TORRES, L. F., ALMEIDA, R., AVILA, S., ALESSI, S. & FREITAS, R. (1990). Brain tumours in south Brazil: a retrospective study of 438 cases. *Arq Neuropsiquiatr* 48, 279-85.
- TSUKIMOTO, M., HARADA, H., IKARI, A. & TAKAGI, K. (2005). Involvement of chloride in apoptotic cell death induced by activation of ATP-sensitive P2X7 purinoceptor. *J Biol Chem* 280, 2653-8.
- TSUKIMOTO, M., MAEHATA, M., HARADA, H., IKARI, A., TAKAGI, K. & DEGAWA, M. (2006). P2X7 receptor-dependent cell death is modulated during murine T cell maturation and mediated by dual signaling pathways. *J Immunol* 177, 2842-50.

- VINCE, G., WAGNER, S., PIETSCH, T., GOLDBRUNNER, R., BOUTERFA, H., ROOSEN, K. & TONN, J. (1997). Intratumoral heterogeneous expression of matrix metalloproteinases in astrocytic tumors. *Anticancer Res* 17, 4061.
- VIRGINIO, C., CHURCH, D., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. (1997). Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36, 1285-94.
- VIRGINIO, C., MACKENZIE, A., RASSENDREN, F. A., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. (1999). Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 2 (4), 315-21.
- WATANO, T., MATSUOKA, I. & KIMURA, J. (2002). Inhibitory effects of metals on ATP-induced current through P2X7 receptor in NG108-15 cells. *Jpn J Pharmacol* 89, 296-301.
- WEI, W., RYU, J. K., CHOI, H. B. & MCLARNON, J. G. (2008). Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells. *Cancer Lett* 260, 79-87.
- WEISMAN, G. A., DE, B. K., FRIEDBERG, I., PRITCHARD, R. S. & HEPPEL, L. A. (1984). Cellular responses to external ATP which precede an increase in nucleotide permeability in transformed cells. *J Cell Physiol* 119, 211-9.
- WHITE, N., BUTLER, P. E. & BURNSTOCK, G. (2005). Human melanomas express functional P2 X(7) receptors. *Cell Tissue Res* 321, 411-8.
- WILEY, J. S., CHEN, R. & JAMIESON, G. P. (1993). The ATP<sub>4</sub>- receptor-operated channel (P2Z class) of human lymphocytes allows Ba<sup>2+</sup> and ethidium<sup>+</sup> uptake: inhibition of fluxes by suramin. *Arch Biochem Biophys* 305, 54-60.
- WILEY, J. S., DAO-UNG, L. P., LI, C., SHEMON, A. N., GU, B. J., SMART, M. L., FULLER, S. J., BARDEN, J. A., PETROU, S. & SLUYTER, R. (2003). An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem* 278, 17108-13.
- WILSON, H. L., WILSON, S. A., SURPRENANT, A. & NORTH, R. A. (2002). Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus. *J Biol Chem* 277, 34017-23.
- WINK, M. R., BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A. S., LENZ, G., ZERBINI, L. F., LIBERMANN, T. A., SEVIGNY, J., BATTASTINI, A. M. & ROBSON, S. C. (2006). Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience* 138, 421-32.
- WINK, M. R., LENZ, G., BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A. S., SCHWARTSMANN, G., SARKIS, J. J. & BATTASTINI, A. M. (2003). Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett* 198, 211-8.
- WORTHINGTON, R. A., SMART, M. L., GU, B. J., WILLIAMS, D. A., PETROU, S., WILEY, J. S. & BARDEN, J. A. (2002). Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X(7) receptor function. *FEBS Lett* 512, 43-6.
- YAMAGUCHI, F., SAYA, H., BRUNER, J. M. & MORRISON, R. S. (1994). Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 484-8.
- YE, Z. C. & SONTHEIMER, H. (1999). Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 59, 4383-91.
- ZHENG, L. M., ZYCHLINSKY, A. & LIU, C. (1991). Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol* 112, 279-88.
- ZIMMERMANN, H. (2001). Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 52, 44-56.

## 7 APÊNDICE

Quadro 6: Notação Convencional dos Aminoácidos.

<b>Aminoácido</b>	<b>Notação em 3 letras</b>	<b>Notação em 1 letra</b>
<b>Glicina</b>	<b>Gly</b>	<b>G</b>
<b>Alanina</b>	<b>Ala</b>	<b>A</b>
<b>Serina</b>	<b>Ser</b>	<b>S</b>
<b>Prolina</b>	<b>Pro</b>	<b>P</b>
<b>Valina</b>	<b>Val</b>	<b>V</b>
<b>Treonina</b>	<b>Thr</b>	<b>T</b>
<b>Cisteína</b>	<b>Cys</b>	<b>C</b>
<b>Leucina</b>	<b>Leu</b>	<b>L</b>
<b>Isoleucina</b>	<b>Ile</b>	<b>I</b>
<b>Asparagina</b>	<b>Asn</b>	<b>N</b>
<b>Ácido Aspártico</b>	<b>Asp</b>	<b>D</b>
<b>Glutamina</b>	<b>Gln</b>	<b>Q</b>
<b>Lisina</b>	<b>Lys</b>	<b>K</b>
<b>Ácido Glutâmico</b>	<b>Glu</b>	<b>E</b>
<b>Metionina</b>	<b>Met</b>	<b>M</b>
<b>Histidina</b>	<b>His</b>	<b>H</b>
<b>Fenilalanina</b>	<b>Phe</b>	<b>F</b>
<b>Arginina</b>	<b>Arg</b>	<b>R</b>
<b>Tirosina</b>	<b>Tyr</b>	<b>Y</b>
<b>Triptofano</b>	<b>Trp</b>	<b>W</b>

Retirado e adaptado de Cantu et al. (2008).

## 8 CURRICULUM VITÆ

### Tamajusuku, A. S. K. ou Tamajusuku, A. S.

#### DADOS PESSOAIS

**Nome:** Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku

**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, RS, Brasil, 11 de novembro de 1980

**Endereço Profissional:** Departamento de Biofísica

Rua Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43.431 – Laboratório 107

CEP: 91.501-970 Porto Alegre/RS (51) 3308-7620

**Endereço eletrônico:** [tamajusuku@yahoo.com.br](mailto:tamajusuku@yahoo.com.br) , [tamajusuku@cpovo.net](mailto:tamajusuku@cpovo.net)

#### FORMAÇÃO

**Bacharelado em Biologia pela UFRGS** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999 a 2002.

**Licenciatura em Biologia pela UFRGS** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003 a 2006.

**Mestrado Acadêmico em Ciências Biológicas – Bioquímica pela UFRGS** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003 a 2005, bolsista do CNPq.

#### ESTÁGIOS

##### **UFRGS – Graduação em Ciências Biológicas**

Set/99 a Jan/00

Monitoria em Biologia Celular

- Acompanhamento das aulas práticas de Biologia Celular para turmas de aproximadamente 25 alunos, orientado pela Prof<sup>a</sup> Nívia Lothhammer, docente responsável da cadeira envolvendo aulas de reforço, correção de exercícios e recuperação de aulas práticas, monitoria voluntária;

##### **UFRGS – Iniciação Científica em Enzimologia no Departamento de Bioquímica**

Jan/00 a Dez/02

Bolsista de Iniciação Científica da FAPERGS

- Acompanhamento das práticas de laboratório em Bioquímica e Biologia Molecular, orientado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Oliveira Battastini e co-orientado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Rosângela Wink, envolvendo experimentos bioquímicos e moleculares, leitura e participação de seminários, participação em salões de iniciação científica e congressos científicos nacionais e internacionais e redação de manuscrito para revistas internacionais;

##### **Colégio Estadual de Ensino Fundamental Felipe de Oliveira – 5ª série**

Set/05 a Dez/05

Docência em Ciências

- Aulas de Ciências para turma de aproximadamente 25 alunos, embasado em Programa orientado pela UFRGS e pela Prof<sup>a</sup> Luciana Andréia Moreschi Paulo envolvendo aulas ministradas, preparação e correção de provas e avaliação final, estágio curricular voluntário;

### **Colégio de Aplicação- UFRGS – 3º ano do Ensino médio**

Mar/06 a Jun/06

Docência em Biologia

- Aulas de Biologia para turma de aproximadamente 35 alunos, embasado em Programa orientado pela UFRGS e pela Prof<sup>a</sup> Msc. Eunice Aita Isaia Kindel, envolvendo aulas ministradas, preparação e correção de provas e avaliação final, estágio curricular voluntário;

### **UFRGS – Graduação em Ciências Biológicas**

Mar/06 a Jun/06

Monitoria em Métodos Biofísicos de Análise

- Acompanhamento das aulas práticas de Métodos Biofísicos de Análise para turmas de aproximadamente 25 alunos, orientado pelo Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Guido Lenz, responsável da cadeira, envolvendo orientação nos exercícios e relatórios de aulas práticas e preparação e correção de prova, estágio curricular voluntário.

### **PRÊMIOS E DISTINÇÕES**

Honra ao mérito, na XXI Reunião Anual da FeSBE 2006, pela apresentação do trabalho intitulado: “Múltiplas NTPDases são expressas por células musculares lisas vasculares em cultura”.

### **ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS**

1. **TAMAJUSUKU, A.S.K.** ; Villodre, Emilly S.; Paulus, Romela; Coutinho-Silva, Robson; Battastini, Ana M.O.; Wink, Márcia R.; Lenz, Guido. Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 109, p. 983-991, 2010.
2. FLORES, D. G. ; de Farias, C.B. ; Leites, J.; de Oliveira, M.S.; Lima, R.C.; **TAMAJUSUKU, A. S. K.** ; Di Leone, L.P. ; Meurer, L. ; Brunetto, A.L. ; SCHWARTSMANN, G. ; LENZ, G. ; Roesler, R. . Gastrin-Releasing Peptide Receptors Regulate Proliferation of C6 Glioma Cells through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Mechanism. *Current Neurovascular Research*, v. 5, p. 99-105, 2008.
3. BRAGANHOL, E.; **TAMAJUSUKU, A.S.K.**; BERNARDI, A.; WINK, M. R.; BATTASTINI, A. M. O. . Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Biochimica et Biophysica Acta. G, General Subjects*, v. 1770, p. 1352-1359, 2007.
4. WINK, M. R. ; BRAGANHOL, E. ; **TAMAJUSUKU, A. S. K.** ; LENZ, G. ; ZERBINI, L. F. ; LIBERMANN, T. A. ; SEVIGNY, J. ; BATTASTINI, A. M. O. ; ROBSON, S. C. . Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience, Estados Unidos*, v. 138, n. 2, p. 421-432, 2006.
5. **TAMAJUSUKU, A. S. K.** ; CARRILLO-SEPULVEDA, M. A. ; BRAGANHOL, E. ; WINK, M. R. ; SARKIS, J. J. F. ; BARRETO-CHAVES, M. L. M. ; BATTASTINI, A. M. O. . Activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 is increased by thyroid hormones in vascular smooth muscle cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 289, n. 1-2, p. 65-72, 2006.

6. BRAGANHOL, E. ; ZAMIN, L. L. ; CANEDO, A. D. ; HORN, F. ; **TAMAJUSUKU, A. S. K.** ; WINK, M. R. ; SALBEGO, C. ; BATTASTINI, A. M. O. . Anti-proliferative effect of quercetin in human U138-MG glioma cell line. *Anti-Cancer Drugs*, v. 17, n. 6, p. 663-671, 2006.

7. WINK, M. R.; BRAGANHOL, E.; **TAMAJUSUKU, A.S.K.**; CASALI, É.A.; KARL, J.; BARRETO-CHAVES, M.L.M.; SARKIS, J.J.F.; BATTASTINI, A. M. O. . Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocytes cultures from different brain regions. *Neurochemistry International*, v. 43, n. 7, p. 621-628, 2003.

8. WINK, M.R.; LENZ, G.; BRAGANHOL, E.; **TAMAJUSUKU, A.S.K.**; SCHWARTSMANN, G. ; SARKIS, J. J. F. ; BATTASTINI, A. M. O. . Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Letters*, EUA, v. 198, n. 2, p. 211-218, 2003.

9. WINK, M.R.; **TAMAJUSUKU, A.S.K.**; BRAGANHOL, E.; BARRETO-CHAVES, M.L.M. ; SARKIS, J.J.F.; BATTASTINI, A.M.O.. Thyroid hormone upregulates ecto-5'-nucleotidase / CD73 in C6 rat glioma cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 205, n. 1, p. 107-114, 2003.

10. BRAGANHOL, E.; **TAMAJUSUKU, A.S.K.**; WINK, M.R.; LENZ, G.; ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN, G.; SARKIS, J.J.F.; BATTASTINI, A.M.O.. INVESTIGAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ATP E ADP E IMUNODETECÇÃO DA ECTO-APIRASE/CD39 EM LINHAGENS DE CÉLULAS DE GLIOMAS DE HUMANOS. *Caderno de Farmácia*, Porto Alegre, v. 17, n. 2, p. 127-130, 2001.

## RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. WINK, M. R., TAMAJUSUKU, A. S. K., VILLODRE, E. S., PAULUS, R., COUTINHO-SILVA, R., BATTASTINI, A. M. O., LENZ, G.

Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma In: *Signaling in cell death, cancer and the immune system*, 2010, Rio das Pedras, RJ.

**Livro de Resumos do Signaling in cell death, cancer and the immune system.** , 2010.

2. TAMAJUSUKU, A. S. K., PAULUS, R., GARICOCHEA, B., BATTASTINI, A. M. O., WINK, M. R., LENZ, G.

ATP CYTOTOXICITY ON GL261 MOUSE GLIOMA CELL LINE AND PRIMARY CULTURE OF GLIOBLASTOMA: EVIDENCES OF P2X7 PURINOCEPTOR INVOLVEMENT IN CELL DEATH In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia.

**XXXVIII Annual Meeting of SBBq.** , 2009.

3. KIPPER, F. C., TAMAJUSUKU, A. S. K., LENZ, G., BATTASTINI, A. M. O., ROBSON, S. C., WINK, M. R.

EXPRESSION OF NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLASE CD39 FAMILY MEMBERS BY GLIOMA CELL LINE U87 In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia.

**XXXVIII Annual Meeting of SBBq.** , 2009.

4. PAULUS, R., TAMAJUSUKU, A. S. K., BATTASTINI, A. M. O., WINK, M. R., LENZ, G.

ATP-induced cell death in GL261 mouse glioma line In: *I IBRO/LARC Congress of Neurosciences of Latin America, the Caribbean and Iberian Peninsula*, 2008, Buzios.

**Livro de Resumos do I IBRO/LARC Congress of Neurosciences of Latin America, the Caribbean and Iberian Peninsula.** , 2008.

5. TAMAJUSUKU, A. S. K., PAULUS, R., COUTINHO-SILVA, R., BATTASTINI, A. M. O., WINK, M. R., LENZ, G.

GL261 mouse glioma cell line is sensitive to ATP cytotoxicity In: *Purines Meeting*, 2008, Copenhagen.

**Purines Meeting 2008 - Purinergic Signalling Journal.** Netherlands: Springer, 2008. v.4. p.150 - 150



6. TAMAJUSUKU, A. S. K., PAULUS, R., BATTASTINI, A. M. O., WINK, M. R., LENZ, G.  
Investigação da expressão do receptor purinérgico P2X7 em linhagens celulares de glioma In: XXII Reunião Anual da FeSBE 2007, 2007, Águas de Lindóia.  
**Livro de Resumos da XXII Reunião Anual da FeSBE 2007.** , 2007.
7. TAMAJUSUKU, A. S. K.  
Atividade da ecto-5'-nucleotidase é aumentada no tratamento com hormônios tireoideanos e estradiol em célula muscular lisa vascular de rato In: XXVII Congresso da Sociedade de Cardiologia do estado de São Paulo, 2006, Campos do Jordão.  
**Livro de resumos do XXVII Congresso da Sociedade de Cardiologia do estado de São Paulo.** , 2006.
8. TAMAJUSUKU, A. S. K., CARRILLO-SEPULVEDA, M. A., BRAGANHOL, E., WINK, M. R., BARRETO-CHAVES, M. L. M., BATTASTINI, A. M. O.  
Múltiplas NTPDases são expressas por células musculares lisas vasculares em cultura In: XXI Reunião Anual da Fesbe, 2006, Águas de Lindóia.  
**Livro de resumos da XXI Reunião Anual da Fesbe.** , 2006.
9. TAMAJUSUKU, A. S. K., BRAGANHOL, E., WINK, M. R., SARKIS, J. J. F., BARRETO-CHAVES, M. L. M., BATTASTINI, A. M. O.  
Atividade da ecto-5'-nucleotidase é aumentada no tratamento com hormônios tireoideanos e estradiol em célula muscular lisa vascular de rato In: XX Reunião Anual da Fesbe, 2005, Águas de Lindóia.  
**Livro de resumos da XX Reunião Anual da Fesbe.** , 2005.
10. TAMAJUSUKU, A. S. K., BRAGANHOL, E., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.  
EFEITO DA QUERCITINA SOBRE A HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA POR GLIOMA 138 In: XIX Reunião Anual da Fesbe, 2004, Águas de Lindóia.  
**Livro de Resumos da XIX Reunião Anual da Fesbe.** , 2004.
11. TAMAJUSUKU, A. S. K., WINK, M. R., CZMADIA, E., BRAGANHOL, E., ZERBINI, L. F., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O., ROBSON, S. C.  
MÚLTIPLAS NTPDASES SÃO EXPRESSAS POR ASTRÓCITOS EM CULTURA In: XIX Reunião Anual da Fesbe, 2004, Águas de Lindóia.  
**Livro de Resumos XIX Reunião Anual da Fesbe.** , 2004.
12. TAMAJUSUKU, A. S. K., WINK, M. R., BRAGANHOL, E., BARRETO-CHAVES, M. L. M., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.  
Hormônio da Tireóide (T3) regula a ecto-5'-nucleotidase/CD73 em células C6 de glioma de rato In: 55a Reunião Anual da SBPC, 2003, Recife.  
**Livro de resumos da 55a Reunião Anual da SBPC.** , 2003.
13. TAMAJUSUKU, A. S. K., WINK, M. R., BRAGANHOL, E., CASALI, É. A., BARRETO-CHAVES, M. L. M., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.  
Hormônio da Tireóide (T3) regula a ecto-5'-nucleotidase/CD73 em células C6 de glioma de rato In: XVIII Reunião Anual da FeSBE, 2003, Águas de Lindóia.  
**Livro de resumos da XVIII Reunião Anual da Fesbe.** , 2003.
14. TAMAJUSUKU, A. S. K., WINK, M. R., BRAGANHOL, E., KARL, J., CASALI, É. A., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.  
A comparative study of ATP, ADP and AMP degradation in rat astrocytes from hippocampus, cortex and cerebellum In: Third International Workshop on Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases, 2002, Woods Hole.  
**Metabolism of extracellular nucleotides: secretion, hydrolysis and signaling.** , 2002.
15. BRAGANHOL, E., WINK, M. R., TAMAJUSUKU, A. S. K., CASALI, É. A., LENZ, G., SCHWARTSMANN, G., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.  
HIDRÓLISE DE ATP E ADP EM CULTURAS DE ASTRÓCITOS E LINHAGENS DE GLIOMAS: UM ESTUDO COMPARATIVO In: XIV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Porto Alegre.  
**Livro de Resumos do XIV Salão de Iniciação Científica.** , 2002.
16. TAMAJUSUKU, A. S. K., WINK, M. R., BRAGANHOL, E., BARRETO-CHAVES, M. L. M., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.  
HORMÔNIO DA TIREÓIDE (T3) REGULA A ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 EM CÉLULAS C6 DE

GLIOMA DE RATOS In: XIV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Porto Alegre.

**Livro de Resumos do XIV Salão de Iniciação Científica.** , 2002.

17. WINK, M. R., LENZ, G., BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A. S. K., SCHWARTSMANN, G., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

Implications of altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in pathology of glioma cells lines In: Third International Workshop on Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases, 2002, Woods Hole.

**Metabolism of extracellular nucleotides: secretion, hydrolysis and signaling.** , 2002.

18. TAMAJUSUKU, A. S. K., BRAGANHOL, E., WINK, M. R., KARL, J., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

INVESTIGAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE ATP E ADP E EXPRESSÃO DA ECTO-APIRASE/CD39 EM ASTRÓCITOS DE HIPOCAMPO DE RATOS In: XIII Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre.

**Livro de resumos do XIII Salão de Iniciação Científica.** , 2002.

19. TAMAJUSUKU, A. S. K., BRAGANHOL, E., WINK, M. R., KARL, J., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

INVESTIGAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE ATP E ADP E EXPRESSÃO DA ECTO-APIRASE/CD39 EM ASTRÓCITOS DE HIPOCAMPO DE RATOS In: XIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Porto Alegre.

. , 2002.

20. WINK, M. R., BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A. S. K., CASALI, É. A., LENZ, G., ROCHA, A. B., SCHWARTSMANN, G., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

Low extracellular ATP and ADP degradation rate in glioma cell lines in relation to astrocytes In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002, Caxambu.

**XXXI Reunião Anual da SBBq - Programa e Resumos.** , 2002. p.203 -

21. WINK, M. R., TAMAJUSUKU, A. S. K., BRAGANHOL, E., BARRETO-CHAVES, M. L. M., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

Thyroid hormone (T3) upregulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 in rat C6 glioma cells In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002, Caxambu.

**XXXI Reunião Anual da SBBq - Programa e Resumos.** , 2002. p.203 -

22. WINK, M. R., TAMAJUSUKU, A. S. K., BRAGANHOL, E., BARRETO-CHAVES, M. L. M., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

Thyroid hormone upregulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 in rat C6 glioma cells In: Third International Workshop on Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases, 2002, Woods Hole.

**Metabolism of extracellular nucleotides: secretion, hydrolysis and signaling.** , 2002.

23. BRAGANHOL, E., WINK, M. R., TAMAJUSUKU, A. S. K., KARL, J., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

Um estudo comparativo sobre a degradação extracelular de ATP, ADP e AMP em astrócitos de hipocampo, córtex e cerebelo In: XIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Porto Alegre.

**Livro de Resumos do XIII Salão de Iniciação Científica.** , 2002.

24. BRAGANHOL, E., WINK, M. R., TAMAJUSUKU, A. S. K., KARL, J., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

A comparative study of ATP, ADP and AMP degradation in rat astrocytes from hippocampus, cortex and cerebellum In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001, Caxambu.

**XXX Reunião Anual da SBBq - Programa e Resumos.** , 2001. p.195 -

25. BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A. S. K., WINK, M. R., LENZ, G., ROCHA, A. B., SCHWARTSMANN, G., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

Investigação da degradação do ATP e ADP e imunodeteção da ecto-apirase/CD39 em linhagens de gliomas de humanos In: XXVII Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos-SAEF, 2001, Porto Alegre.

**Caderno de Farmácia.** Porto Alegre: , 2001. v.17. p.127 - 130

26. WINK, M. R., BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A. S. K., KARL, J., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

Investigation of ATP and ADP degradation and ecto-apyrase/CD39 expression in rat hippocampus astrocytes In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001, Caxambu.

**XXX Reunião Anual da SBBq - Programa e Resumos.** , 2001. p.119 -

27. TAMAJUSUKU, A. S. K., BRAGANHOL, E., WINK, M. R., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O. Partial characterization of ATP-diphosphohydrolase in synaptic plasma membrane, myelin and mitochondrial Fractions from rat brain-a comparative study In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001, Caxambu.

**XXX Reunião Anual da SBBq - Programas e Resumos.** , 2001. p.195 -

28. BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A. S. K., WINK, M. R., LENZ, G., ROCHA, A. B., SCHWARTSMANN, G., SARKIS, J. J. F., BATTASTINI, A. M. O.

Investigação da degradação do ATP e ADP e imunodeteção da ecto-apyrase/CD39 em linhagens de glioma de humanos In: XII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2000, Porto Alegre.

**Livro de Resumos do XII Sãolão de Iniciação Cietífica.** , 2000.