

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROFESSOR TUISKON DICK
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**EFEITO DO MEIO CONDICIONADO DE GLIOMA SOBRE A
DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS: ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO
PURINÉRGICA**

LETÍCIA SCUSSEL BERGAMIN

Porto Alegre, fevereiro de 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROFESSOR TUISKON DICK
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**EFEITO DO MEIO CONDICIONADO DE GLIOMA SOBRE A
DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS: ENVOLVIMENTO DA SINALIZAÇÃO
PURINÉRGICA**

**Letícia Scussel Bergamin
Orientadora: Ana Maria Oliveira Battastini**

**Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre.**

Banca examinadora:

**Profa. Dra: Vera Maria Treis Trindade
Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Prof. Dr: Fábio Klamt
Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Profa. Dra: Maria Martha Campos
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**

Porto Alegre, fevereiro de 2012

**“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que
deixa de existir.” Steve Jobs**

**“Você tem que estar preparado para se queimar em sua própria chama:
como se renovar sem primeiro se tornar cinzas?” Zaratustra**

DEDICO

**Para as três pessoas que mais me orgulham, mais eu admiro e
mais me enchem de alegria:**

Meus amados pais, Eugenio e Vani

Meu amado irmão Jorge

AGRADECIMENTOS

A Ana, pela orientação, tanto durante a minha iniciação científica como no mestrado, em que pude aprender muito com sua experiência profissional, pela ajuda e pelo incentivo à pesquisa.

A Elizandra, pelo auxílio tanto na parte experimental como na parte teórica dessa dissertação. Obrigada pelas trocas de idéias. Obrigada pelos conselhos e por me ensinar tanto.

Ao Rafael, pela amizade, pelos conselhos e idéias. Obrigada por estar sempre disposto a me ajudar! Obrigada pela ajuda em tantos experimentos e também nas correções dessa dissertação! Ah, obrigada também, por sempre ir (com a maior boa vontade) buscar os meus camundongos.

A todos colegas do laboratório 22, Lila, Fabrícia, Fabrício, Angélica, Fran, Cris, Manoela, Vanessa, Fernanda e Elisa por tornarem o laboratório um ambiente ótimo de trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica que contribuíram para a realização desse trabalho de mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Paula, minha cunhada, as minhas amigas Camila, Carina, Natália e Désirée por sempre estarem por perto quando eu precisei.

As minhas tias, Claudia e Rose por serem mais que tias, grandes amigas! Por sempre torcerem por mim e vibrar junto comigo nas minhas vitórias.

Ao meu irmão, Jorge, pelo seu coração enorme, sempre preocupado comigo e com meu bem estar. Espero ser uma profissional tão boa quanto tu és, como médico. A ti meu carinho e amor.

Ao meu pai, Eugenio e a minha mãe, Vani, pelo exemplo de honestidade, garra e amor. Com certeza, vocês são as pessoas que mais me orgulham e é em vocês que sempre me espelho. Obrigada pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas, por me aconselharem e por tornarem a minha vida ainda mais feliz! Amo vocês acima de qualquer coisa.

RESUMO

Gliomas são os tumores mais comuns e devastadores do sistema nervoso central. A presença de um ambiente inflamatório, incluindo macrófagos associados ao tumor (TAM), auxiliam a proliferação tumoral e estão associados a um pior prognóstico em pacientes com essa neoplasia. A interrupção da sinalização purinérgica também tem sido implicada na progressão do câncer. O ATP pode atuar como uma molécula de sinalização de dano celular, enquanto a adenosina, o produto da degradação do ATP, serve como um mecanismo de feedback negativo para limitar a inflamação. A comunicação de nucleotídeos é controlada pela ação de ectonucleotidases, tais como ENTPDase e ecto-5'-nucleotidase/CD73. Com isso, investigamos se a exposição de macrófagos ao meio condicionado de GL261 (GL-CM) modulam o fenótipo de macrófagos, bem como as atividades das ectonucleotidases. O envolvimento de receptores purinérgicos na secreção de citocinas por macrófagos também foi investigado. Os macrófagos expostos a GL-CM apresentam uma diminuição da atividade da iNOS, baixos níveis de secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12 e alto nível de secreção da citocina anti-inflamatória IL-10. A expressão de genes como FIZZ1 e Ym1 foi aumentada. A hidrólise de ATP, ADP e AMP foi diminuída em macrófagos estimulados com GL-CM. A citometria de fluxo e Real-Time PCR mostraram uma significativa mudança na expressão de proteínas para a ENTPDase 2 e 3 e houve alteração do nível de mRNA para a ENTPDase 1 e ecto-5'-NT/CD73. Houve também um aumento da secreção das citocinas IL-6, IL-10 e MCP-1 por macrófagos expostos a GL-CM. Este efeito foi revertido pela suramina, indicando a participação de ATP na secreção dessas citocinas. Em conclusão, os macrófagos expostos ao meio condicionado de gliomas foram modulados a um fenótipo análogo ao M2 (TAM), que foram acompanhadas por uma diminuição na hidrólise de nucleotídeos. Portanto, nossos resultados fornecem evidências para o envolvimento da hidrólise extracelular de nucleotídeos no processo inflamatório associado à progressão tumoral.

Palavras chaves:

Glioma, TAM e Sinalização Purinérgica

ABSTRACT

Gliomas are the most common and devastating type of primary brain tumors. The presence of an inflammatory environment, including tumor-associated macrophages (TAM), promote tumor proliferation and are associated with a poor prognosis in patients with this malignancy. Disruption of purinergic signalling also has been implicated in cancer progression. ATP can act as danger signaling whereas adenosine, the ATP breakdown product, serves as a negative feedback mechanism to limit inflammation. The nucleotide communication is controlled by the action of ectonucleotidases, such as E-NTPDase and ecto-5'-nucleotidase/CD73. Herewith we investigate if the exposure of macrophage cells to conditioned medium of GL261 (GL-CM) cell cultures modulate macrophage differentiation as well as the ectonucleotidase activities. The involvement of purine receptors in the secretion of cytokines by macrophages was also investigated. Macrophages exposed to GL-CM exhibits decreased iNOS activity, release low levels of the pro-inflammatory cytokine TNF- α and IL-12 and high levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The expression of genes FIZZ1 and Ym1 was increased too. The hydrolysis of ATP, ADP and AMP was decreased in macrophages stimulated with GL-CM. Flow cytometry and Real Time-PCR analysis showed a significant changed in NTPDase 2 and 3 protein and mRNA expression of NTPDase 1 and ecto-5'-NT/CD73, respectively. There was also an increase in IL-6, IL-10 and MCP-1 secretion by macrophages exposed to GL-CM. This effect was reversed by suramin, indicating the participation of ATP in the secretion of these cytokines. In conclusion, macrophages exposed to glioma conditioned medium showed a polarized to M2-like (TAM) phenotype, which were accompanied by a decrease in the nucleotide hydrolysis, providing further evidence for the involvement of the extracellular nucleotide hydrolysis in the inflammatory process associated to tumor progression.

Key words:

Glioma, TAM and Purinergic signaling

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRs- regiões conservadas da apirase
ADP- adenosina difosfato
AMP- adenosina monofosfato
ATP- adenosina trifosfato
CCL- quimiocina
COX-2- ciclooxygenase 2
Ecto-5'NT/CD73- ecto-5'-nucleotidase
EGF- fator de crescimento epidermal
ENTPDase- ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
FGF- fator de crescimento de fibroblasto
GBM- glioblastoma multiforme
G-CSF- fator de estimulação de colônias de granulócitos
GL-CM- meio condicionado de glioma
GM-CSF- fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos
GPI- glicosil-fosfatidilinositol
HIF-1- fator 1 induzido por hipóxia
IL- interleucina
INF γ - interferon gama
LPS- lipopolissacarídeo
MCP-1/CCL2- proteína quimioatrativa de monócitos
NF- κ B- fator nuclear kappa
NO- óxido nítrico
OMS - Organização Mundial da Saúde
P1- receptor purinérgico metabotrópico para adenosina
P2X- receptor purinérgico ionotrópico
P2Y- receptor purinérgico metabotrópico
PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas
SNC- Sistema Nervoso Central
TAM- macrófago associado ao tumor
TGF- α - fator de transformação do crescimento alfa
TGF- β - fator de transformação do crescimento beta

TLR- receptores do tipo Toll

TNF- α - fator de necrose tumoral- alfa

UDP- uridina difosfato

UTP- uridina trifosfato

VEGF- fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DAS FIGURAS

- Figura 1:** *Bases moleculares do câncer.....2*
- Figura 2:** *Relação entre os graus de malignidade tumoral, sobrevida e alterações moleculares que levam a formação de glioblastomas primários (De novo) ou secundário.....4*
- Figura 3:** *Ativação, produção de citocinas e principais funções dos macrófagos quando ativados em um fenótipo M1 ou M2..... 8*
- Figura 4:** *Diferentes mediadores produzidos por diferentes células que levam a ativação dos macrófagos para um fenótipo M2..... 9*
- Figura 5:** *Visão geral do mecanismo de recrutamento de macrófagos, sua diferenciação e a polarização para o fenótipo M212*
- Figura 6:** *Estrutura dos receptores P1, P2Y e P2X..... 14*
- Figura 7:** *Estrutura das diferentes ectonucleotidases..... 16*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer.....	1
1.2 Gliomas.....	2
1.3 Inflamação	5
1.4 Macrófagos.....	6
1.5 Macrófagos Associados ao Tumor (TAM).....	9
1.6 Sistema Purinérgico.....	12
1.6.1 Nucleotídeos extracelulares e Purinoreceptores.....	12
1.6.2 Ectonucleotidases.....	14
1.7 Ectonucleotidases, Gliomas e Inflamação.....	16
2. OBJETIVOGERAL.....	18
2.1 Objetivos Específicos.....	18
3. RESULTADOS.....	19
3.1 Manuscrito a ser submetido para a revista <i>Purinergic Signalling</i>	19
4. DISCUSSÃO.....	52
5. CONCLUSÕES.....	57
6. PERSPECTIVAS.....	58
7. REFERÊNCIAS.....	59
8. ANEXOS.....	68
8.1 Produção científica durante o período do mestrado.....	68
8.2 Normas para submissão de artigos para a Revista <i>Purinergic Signalling</i>	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Neoplasia significa literalmente “crescimento novo”, ou seja, massa anormal de tecido, cujo crescimento ultrapassa e não é coordenado com os tecidos normais. O termo tumor foi originalmente aplicado ao intumescimento causado por inflamação. As neoplasias também podem causar intumescimentos, entretanto com o decorrer do tempo, o uso não neoplásico do termo “tumor” foi abandonado e hoje um é sinônimo do outro. As neoplasias podem ser divididas em neoplasias malignas e benignas, sendo o câncer uma neoplasia maligna (Cotran et al., 2000).

Os tumores malignos apresentam uma velocidade de crescimento errática, são altamente invasivos, infiltram-se pelos tecidos adjacentes normais e frequentemente espalham-se para outras regiões do corpo, causando as metástases (Cotran et al., 2000).

O câncer tem origem molecular e as principais causas genéticas são: mutação no DNA da célula causada por agentes químicos, radiação, vírus ou por mutação herdada. E também uma origem a nível fenotípico, uma vez que alguns hábitos alimentares, cigarro, álcool entre outros podem desencadear certos tipos de tumores (Cotran et al., 2000), (Figura 1).

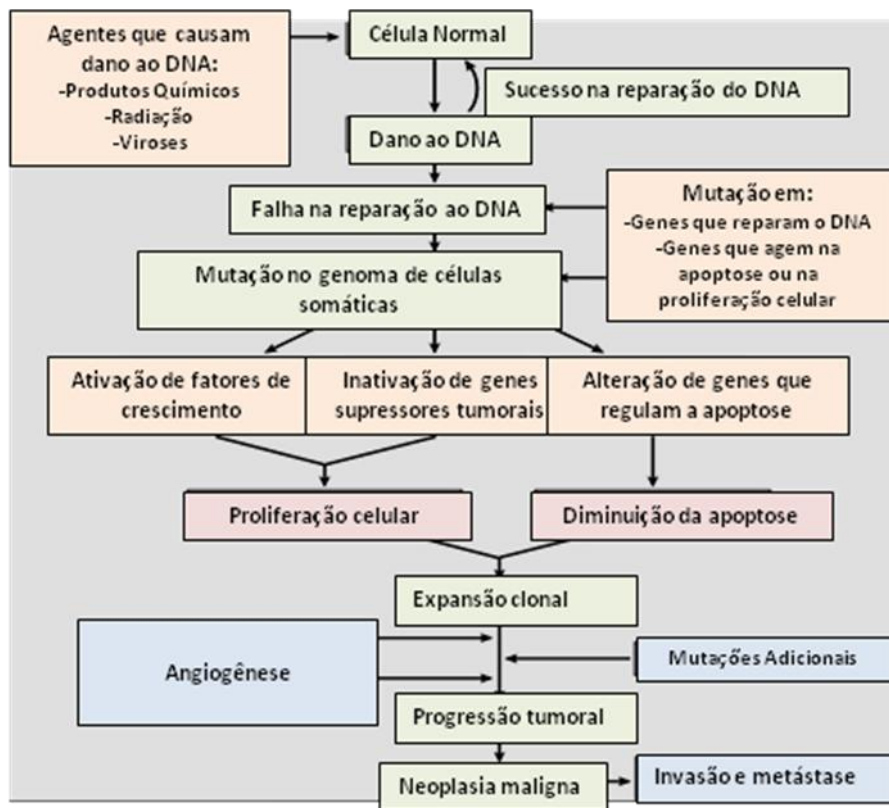


Figura 1: As bases moleculares do câncer (Adaptado de Cotran et al., 2000).

1.2 GLIOMAS

Glioma é o tipo tumoral que mais acomete o sistema nervoso central, correspondendo a cerca de 80% de todas as malignidades desse órgão (Sathornsumetee et al., 2007). Embora a prevalência de gliomas malignos (grau III e grau IV) seja de apenas 1,5% em relação a outros tumores, intensos estudos têm sido realizados, pois os gliomas são altamente agressivos e sempre levam a óbito, em no máximo 15 meses (Sathornsumetee et al., 2007; Sampedro et al., 2011).

A taxa de incidência de gliomas aumenta com a idade, sendo a maior prevalência principalmente na faixa etária entre 45 a 64 anos (Hess et al., 2004) e mais comuns em homens e em pessoas brancas (Fisher et al., 2007). Os gliomas apresentam uma grande variação clínica dependendo do grau de malignidade (Sathornsumetee et al., 2007).

A organização mundial da saúde (OMS) classifica esses tumores em

quatro graus de malignidade (Sampedro et al., 2011), (Figura 2):

- tumores de grau I, astrocitomas pilocíticos, que acometem principalmente crianças com idade entre 5 a 15 anos, apresentando baixa capacidade invasiva e sendo facilmente removidos por ressecção cirúrgica;

- tumores de grau II, astrocitomas de baixo grau, crescem de forma relativamente lenta, podendo ou não invadir o tecido cerebral normal adjacente;

- tumores de grau III, astrocitomas anaplásticos, podem ser tumores recorrentes de neoplasias de baixo grau, apresentam uma taxa de crescimento maior que os anteriores e invadem o tecido adjacente normal. Após o tratamento, a recorrência desse tumor é elevada;

- tumores de grau IV, glioblastomas multiformes (GBM), maior grau de malignidade e altamente invasivos. Pacientes com esse tipo tumoral apresentam um péssimo prognóstico, com uma baixa sobrevida. A análise histopatológica desses tumores evidencia focos de necrose, neovascularização, núcleos mitóticos e grande infiltrado inflamatório (Daí e Holland, 2001; Konopka e Bonni, 2003; Wen e Kesari, 2008). Os GBM são divididos em dois subtipos: glioblastomas primários, de origem direta de células precursoras gliais, ocorrendo em pacientes com idade superior a 50 anos e glioblastomas secundários, que ocorrem em pacientes jovens e são provenientes de gliomas de menor grau de malignidade, sendo que os dois tipos de GBM apresentam diferenças moleculares, mas são morfologicamente indistinguíveis (Watanabe et al., 1996).

Os gliomas podem ser ainda classificados como oligodendrogliomas e oligoastrocitomas anaplásticos (Rousseau et al., 2008).

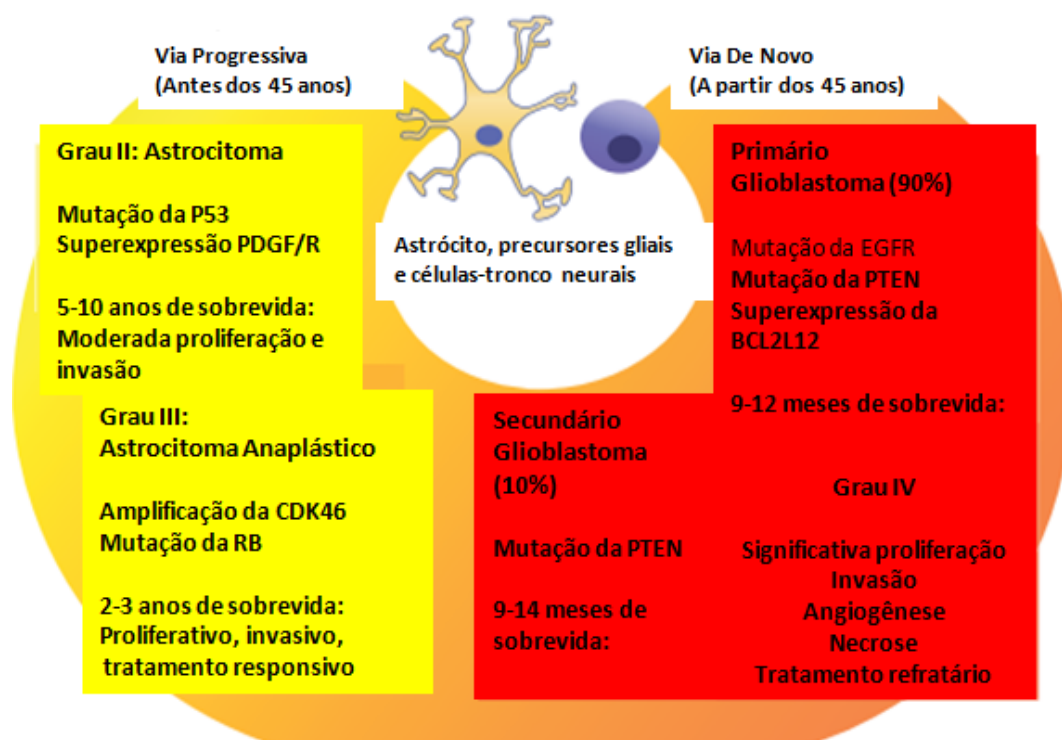


Figura 2: Relação entre os graus de malignidade tumoral, sobrevida e alterações moleculares que levam a formação de glioblastomas primários (De novo) ou secundário (Adaptado de Sampedro et al., 2011).

Pacientes com glioblastoma multiforme podem ter sintomas como dores de cabeça, náuseas, vômitos, confusão mental, mudança de personalidade, perda de memória e convulsões (Wen e Kesari, 2008), sendo que ausência de sintomas neurológicos e baixa idade são fatores que favorecem um melhor prognóstico (Lacroix et al., 2001). O tratamento de primeira escolha é a cirurgia, seguido do uso de radioterapia e quimioterapia (Lacroix et al., 2001). Entretanto, nenhum desses métodos é completamente efetivo, uma vez que a ressecção completa do tumor é limitada devido ao alto grau de invasividade no tecido cerebral normal, tendo, portanto, uma alta recorrência (Sampedro et al., 2011). O uso de quimioterápicos também não é tão eficaz devido à presença da barreira hematoencefálica e a grande heterogeneidade celular: esses tumores são compostos de células neoplásicas em proliferação e muitas células do sistema imune e os fármacos tornam-se ineficazes em combater todos esses tipos celulares (Wen e Kesari, 2008; Sampedro et al., 2011).

Recentemente foi demonstrado que a progressão dos gliomas é um

processo multifatorial, consistindo de numerosas alterações genéticas e fisiológicas que afetam as interações entre células tumorais, neurônios, glia, sistema vascular e sistema imune (Demuth e Berens, 2004). Portanto, o processo inflamatório é um componente crítico da progressão dos gliomas.

1.3 INFLAMAÇÃO

É uma resposta adaptativa desencadeada por estímulos nocivos e condições como infecção e dano tecidual (Medzhitov, 2008). Esse processo tem como objetivo final livrar o organismo da causa inicial da lesão celular (como micróbios e toxinas) e das consequências dessa lesão (tecidos necróticos). Portanto, a inflamação serve para destruir, diluir ou encerrar o agente lesivo, porém torna-se necessário também que ocorra o controle desse processo com subsequente cicatrização e reparação do tecido danificado (Cotran et al., 2000). A reparação tecidual começa nas fases iniciais da inflamação, mas geralmente é concluída apenas depois que a causa nociva tenha sido controlada (Cotran et al., 2000).

A inflamação pode ser dividida em:

- Aguda: tem uma duração curta, variando de minutos a dias, e as principais características são a formação de edema e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Como resposta a esse processo pode ocorrer a resolução completa da inflamação, ou seja, neutralização do estímulo nocivo e restauração tecidual, ou pode ocorrer a formação de abscesso, principalmente quando as infecções ocorrerem por microorganismo piogênico, ou ainda ocorrer a progressão da resposta tecidual para uma inflamação crônica (Cotran et al., 2000; Medzhitov, 2008);

- Crônica: tem duração mais longa, de meses a anos, presença, principalmente, de macrófagos e linfócitos, angiogênese, fibrose e necrose tecidual. Esse tipo de inflamação pode ser originado a partir de uma inflamação aguda ou pode ser uma resposta crônica desde o início, como, por exemplo, em infecções persistentes por bacilos da tuberculose e fungos, doenças auto-

imunes e por exposição prolongada a agentes tóxicos (Cotran et al., 2000; Medzhitov, 2008). Os principais “atores” desse tipo de resposta são os macrófagos (Cotran et al., 2000; Medzhitov, 2008).

1.4 MACRÓFAGOS

Os macrófagos são essenciais para a defesa do organismo, atuam tanto na resposta inata como na resposta adaptativa e são críticos para a resposta inflamatória, uma vez que são a maior fonte de mediadores inflamatórios (Siveen e Kuttan, 2009).

Essas células têm uma capacidade fagocítica extraordinária: por dia eles retiram da circulação cerca de 2×10^{11} eritrócitos, isso corresponde a cerca de 3 Kg de ferro e hemoglobina reciclados por ano. Esse processo metabólico é essencial para a sobrevivência do organismo humano (Mosser e Edwards, 2008). Além disso, os macrófagos atuam no combate a patógenos, na regulação do metabolismo lipídico e remodelação do tecido após dano (Classen et al., 2009).

Durante a embriogênese, precursores de monócitos colonizam sítios extravasculares e tornam-se macrófagos residentes, adquirindo características morfológicas e funcionais de cada tecido os quais residem. Como por exemplo, no cérebro são as células microgliais, no fígado as células Kupffer, entre outros. Após o nascimento, monócitos circulantes são capazes de migrar para vários tecidos em resposta a dano ou infecção, onde se transformam em macrófagos (Gordon, 2007).

Os macrófagos residentes habitualmente se mantêm em um caráter quiescente e nessa condição eles não liberam citocinas, porém esse tipo celular tem uma extraordinária plasticidade que permite responder eficientemente aos sinais do ambiente e mudar o seu fenótipo (Gordon, 2003). Assim os macrófagos têm sido classificados de acordo com o seu fenótipo em M1 e M2 (Figura 3). No qual, macrófagos M1 representam um extremo de ativação e macrófagos M2 o outro extremo de ativação (Gordon, 2003;

Mantovani et al., 2004a; Martinez et al., 2008; Mosser e Edwards, 2008).

O fenótipo M1, ativação clássica, é desencadeado em resposta ao interferon-gama (INF- γ), citocina produzida por linfócitos ativado na forma Th1 e também por células natural killer (NK) em conjunto com agonistas de TLRs (toll-like receptors), tais como lipopolissacarídeos (LPS) (Mantovani et al., 2004a; Gordon, 2007). Quando são ativados para esse fenótipo, os macrófagos atuam como verdadeiros soldados combatendo patógenos de origem bacteriana e viral e eliminando células neoplásicas através da produção de citocinas pró- inflamatórias e mediadores (TNF- α , IL-12 e IL-8) e NO (óxido nítrico) (MacMicking et al., 1997; Sunderkotter et al., 2004; Classen et al., 2009).

Os macrófagos são ativados para o fenótipo M2, ativação alternativa, (Figuras 3 e 4), principalmente devido a exposição de IL-4 e/ou IL-13 (Raes et al., 2002; Gordon, 2003, 2007) que são citocinas produzidas por linfócitos T, durante a resposta Th2 (Nelms et al., 1999; Varin e Gordon, 2009). Além dessa forma de ativação, muitas células tumorais podem produzir IL-10, IL-4, IL-13, IL-6 e prostaglandinas que podem levar a diferenciação dos macrófagos para esse fenótipo (David e Kroener, 2011). Essa via proporciona uma diminuição do processo inflamatório, estimula a angiogênese, estimula a eliminação de restos celulares e corpos apoptóticos, além de contribuir para a deposição de matriz extracelular (Mosser e Edwards, 2008). Esse fenótipo é caracterizado pela alta produção por macrófagos de IL-10 e IL-6, baixa produção de IL-12 e TNF- α , baixa habilidade de atuar como célula apresentadora de antígeno e alta atividade da enzima arginase. Nesse fenótipo, os macrófagos ainda possuem uma alta expressão dos genes FIZZ1 e YM1. Portanto, quando no fenótipo M2, os macrófagos atuam na produção de fatores que levam a supressão de linfócitos T, fazem a remoção de restos celulares, atuam no processo de formação de novos vasos, reparação e remodelamento dos tecidos lesados (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008).

Na literatura, recentes estudos têm proposto uma nova classificação para a ativação dos macrófagos. Os autores sugerem que a classificação dos

macrófagos deve ser baseada na função que eles exercem na manutenção da homeostasia (Edwards et al., 2006; Mosser e Edwards, 2008). Nessa proposta, os macrófagos seriam classificados em três grupos de acordo com as diferentes funções: macrófagos classicamente ativados (equivalente à ativação clássica, M1), produzem baixas quantidades de IL-10 e muita de IL-12, macrófago de regeneração (equivalente ao macrófago alternativo, M2), produzem quantidades semelhantes de IL-10 e IL-12 e macrófagos regulatórios, que produzem altas quantidades de IL-10, pouca IL-12 e TNF- α (Mosser e Edwards, 2008). No entanto, como não há consenso até o momento na literatura, a classificação M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa) continua prevalecendo. Hoje, já se fala também em macrófagos associados ao tumor (que seriam macrófagos com características semelhantes a um fenótipo M2 e com características também de macrófagos regulatórios) (Murray e Wynn, 2011).

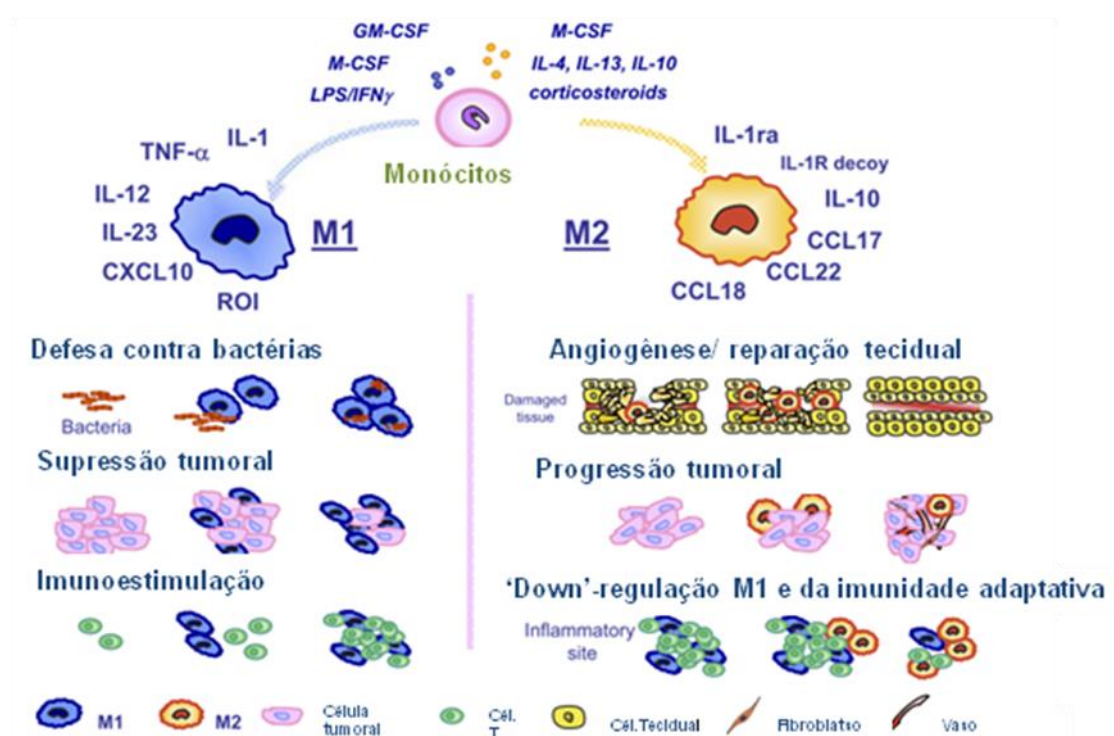


Figure 3: Ativação, produção de citocinas e principais funções dos macrófagos quando ativados em um fenótipo M1 ou M2 (Adaptado de Solinas et al., 2009).

É importante que ocorra um fino balanço entre as diferentes ativações,

pois um aumento da resposta M1 pode levar a doenças inflamatórias crônicas, enquanto que um número descontrolado de macrófagos M2 pode promover a supressão da resposta imune e desenvolvimento de diversos tipos tumorais (Mantovani et al., 2004a; Condeelis et al., 2006).

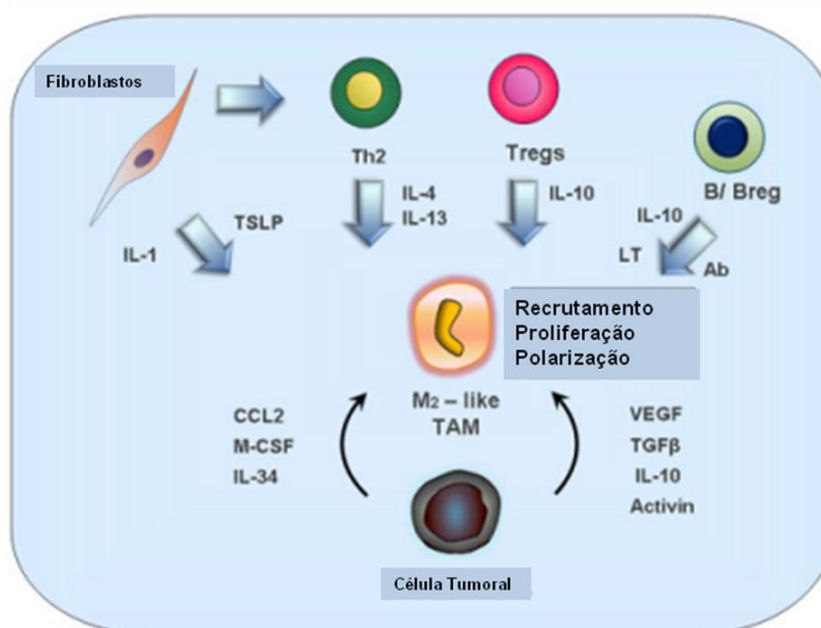


Figura 4: Diferentes mediadores produzidos por diferentes células que levam a ativação dos macrófagos para um fenótipo M2 (Adaptado de Mantovani et al., 2011).

1.5 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR (TAM)

A associação entre câncer e inflamação é datada do ano de 1863, quando Rudolf Virchow notificou a presença de leucócitos em áreas tumorais (Balkwill e Mantovani, 2001). Hoje já se sabe que a inflamação tem um papel chave na iniciação e progressão de tumores. Muitos tipos de câncer desenvolvem-se em sítios onde ocorre inflamação, infecção ou irritação crônica (Brigati et al., 2002; Libby, 2002).

O sistema imune existe no organismo para rejeitar tumores, através de produção de citocinas inflamatórias, mas em algumas situações, não completamente compreendidas, as células imunológicas são recrutadas e moduladas pelo tumor estabelecendo condições favoráveis à progressão dessa malignidade (Siveen e Kuttan, 2009).

Obesidade, tabaco, álcool, estresse, agentes infecciosos e irradiação são responsáveis por mais de 95% de todos os tipos de câncer e esses fatores são capazes de levar à ativação do fator de transcrição NF-κB (Aggarwal e Gehlot, 2009). Esse fator de transcrição é responsável pela regulação de diversas substâncias envolvidas com a inflamação como o fator de necrose tumoral (TNF-α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), quimiocinas, ciclooxigenase 2 (COX-2), metaloproteinases e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Portanto, a ativação do NF-κB é uma das formas que se pode correlacionar câncer com agentes ambientais e inflamação (Aggarwal e Gehlot, 2009).

Outra forma que se pode correlacionar inflamação e tumores é através dos macrófagos. A massa tumoral é extremamente heterogênea, composta por muitas células neoplásicas em proliferação e células do sistema imune, como células endoteliais, fibroblastos e macrófagos (Solinas et al., 2009). Os macrófagos chegam à área tumoral devido à liberação principalmente de MCP-1/CCL2 (proteína quimioatrativa de monócitos), porém fatores como GM-CSF (fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos), VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), fibronectina, fibrinogênio também são também capazes de recrutar essas células (Balkwill, 2004; Allavena et al., 2008).

Ao chegar ao tumor, diferentes estímulos modulam o fenótipo dos macrófagos. Diversos estudos demonstram que os macrófagos associados ao tumor (TAM) se assemelham a um fenótipo M2 (ativação alternativa), ou seja, com atividade anti-inflamatória/pró-tumoral, em contraste com o fenótipo M1 (ativação clássica), pró-inflamatório/antitumoral, (Balkwill e Mantovani, 2001; Coussens e Werb, 2002).

Os TAM expressam e secretam uma série de substâncias que promovem angiogênese como VEGF, GM-CSF, TGF-β e IL-8/CXCL8 e também produzem enzimas que modulam a angiogênese, através da quebra da matriz extracelular, como as metaloproteinases (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12) (Hu et al., 1993; Pepper, 2001). Os TAM geralmente se localizam em áreas

necróticas, que são regiões caracterizadas por baixa tensão de oxigênio. Essa localização preferencial é regulada pela produção de fator 1 induzido por hipóxia (HIF-1), que atrai os macrófagos até as áreas não vascularizadas (Siveen e Kuttan, 2009). Nessas áreas, portanto, os macrófagos auxiliam para a formação de novos vasos sanguíneos e como consequência a progressão tumoral (Siveen e Kuttan, 2009).

Os macrófagos associados ao tumor afetam também a resposta imune adaptativa, criando um ambiente imunossuprimido, não somente devido à produção de IL-10 (citocina anti-inflamatória), mas também pela produção de quimiocinas como CCL17 e CCL22 que recrutam células T regulatórias e linfócitos Th2. Essas quimiocinas são produzidas pelos macrófagos M2. Ainda, os macrófagos produzem CCL18 que recrutam células T naive. A atração dessas células em um microambiente caracterizado por células M2 é como induzir anergia as células T (Figura 5) (Balkwill, 2004; Mantovani et al., 2004b).

Em gliomas, os macrófagos representam até 50% da massa tumoral havendo uma alta expressão de MCP-1, IL-8/CXCL8 e IL-6. Nesse tipo tumoral, os TAM atuam como o principal promotor do crescimento tumoral e o principal causador de angiogênese devido à alta produção de IL-8/CXCL8 pelas células dos gliomas via estímulos inflamatórios ou através da via da NF- κ B (Hong et al., 2009).

Portanto, inibir o recrutamento ou a sobrevivência dos TAM na área do tumor e restaurar a capacidade citotóxica dos macrófagos poderiam servir como terapias no combate de diferentes tipos tumorais (Solinas et al., 2009). Estudos demonstraram que a produção de compostos como NO e TNF- α por macrófagos causam a citotoxicidade tumoral. Essas moléculas são produzidas principalmente quando os macrófagos encontram-se em seu fenótipo M1 (Solinas et al., 2009). Então, o fino balanço entre os fenótipos M1 e M2 seria um aspecto fundamental para o tratamento de algumas neoplasias, incluindo os gliomas (Siveen e Kuttan, 2009; Solinas et al., 2009).

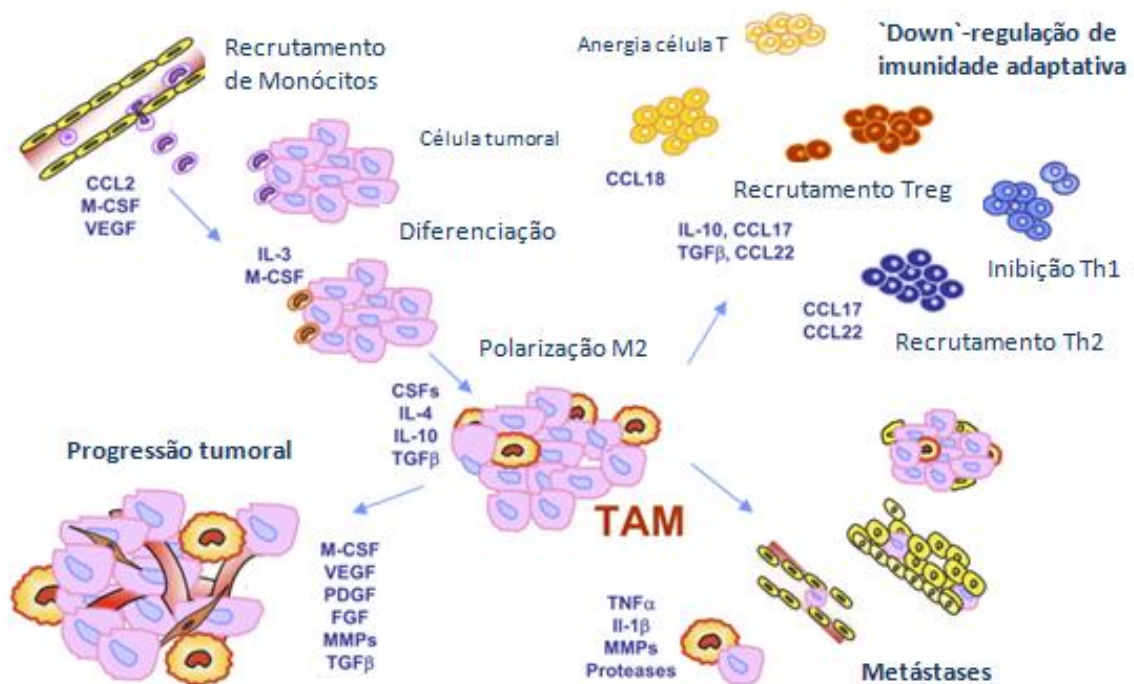


Figura 5: Visão geral do mecanismo de recrutamento de macrófagos, sua diferenciação e a polarização para o fenótipo M2 (Adaptado de Solinas et al., 2009).

1.6 SISTEMA PURINÉRGICO

1.6.1 Nucleotídeos extracelulares e Purinoreceptores

O ATP (adenosina 5'-trifosfato) e outros nucleotídeos e nucleosídeos são encontrados em todos os sistemas orgânicos e produzem efeitos biológicos tanto no meio intracelular bem como no meio extracelular (Illes et al., 2000; Yegutkin, 2008). O ATP intracelular serve como molécula energética para processos como transporte ativo, mobilidade celular e biossíntese, enquanto que o ATP extracelular é uma potente molécula sinalizadora (Yegutkin, 2008). O ATP e outros nucleotídeos (ADP, UTP, UDP) atuam na neurotransmissão, neuromodulação, resposta imune, controle do tráfego de leucócitos do sangue para os tecidos, agregação plaquetária, dor entre outras funções (Burnstock, 2004). O ATP é liberado para o meio extracelular devido a dano celular, hipóxia ou estresse mecânico (Verkhasky et al., 2009). Pode ser armazenado em vesículas sinápticas e ser liberado por exocitose como um co-transmissor

juntamente com outros neurotransmissores como, por exemplo, a acetilcolina e o glutamato (Zimmermann, 1994). Além disso, estudos apontam que o ATP pode ser liberado por exocitose vesicular nas células neuronais e nas não neuronais por transportadores que ligam ATP ou via canais acoplados à conexina ou panexina (Sabirov e Okada, 2005).

A adenosina, um produto de degradação dos nucleotídeos extracelulares, pode ser considerada uma molécula sinalizadora de dano celular, exercendo em geral ações contrárias as do ATP extracelular (Frantz et al., 2005; Bours et al., 2006). A adenosina age mediando uma resposta imunossupressora para proteger os tecidos adjacentes à inflamação dos ataques promovidos pelas células de defesa (Sitkovsky e Ohta, 2005).

Todos os efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeos ocorrem através dos seus receptores.

Os purinoreceptores são divididos em receptores do tipo P1 e P2 (Illes et al., 2000). Os receptores para adenosina (P1) são subdivididos em A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃ e todos estão acoplados à proteína G e modulam a atividade da adenilciclase de forma inibitória (A₁ e A₃) ou estimulatória (A_{2a}, A_{2b}) (Palmer e Stiles, 1995) (Figura 6).

Os receptores P2 são subdivididos em P2X e P2Y. Os receptores ionotrópicos do ATP (P2X) estão ligados a canais iônicos (Na⁺/K⁺/Ca²⁺) e até o momento foram clonados e caracterizados sete membros: P2X₁ até P2X₇ (Abbracchio e Burnstock, 1994). Os receptores P2Y (metabotrópicos), similares aos receptores P1, também são acoplados à proteína G e divididos em P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14} e são sensíveis as purinas e pirimidinas di- e trifosfatadas (White e Burnstock, 2006) (Figura 6).

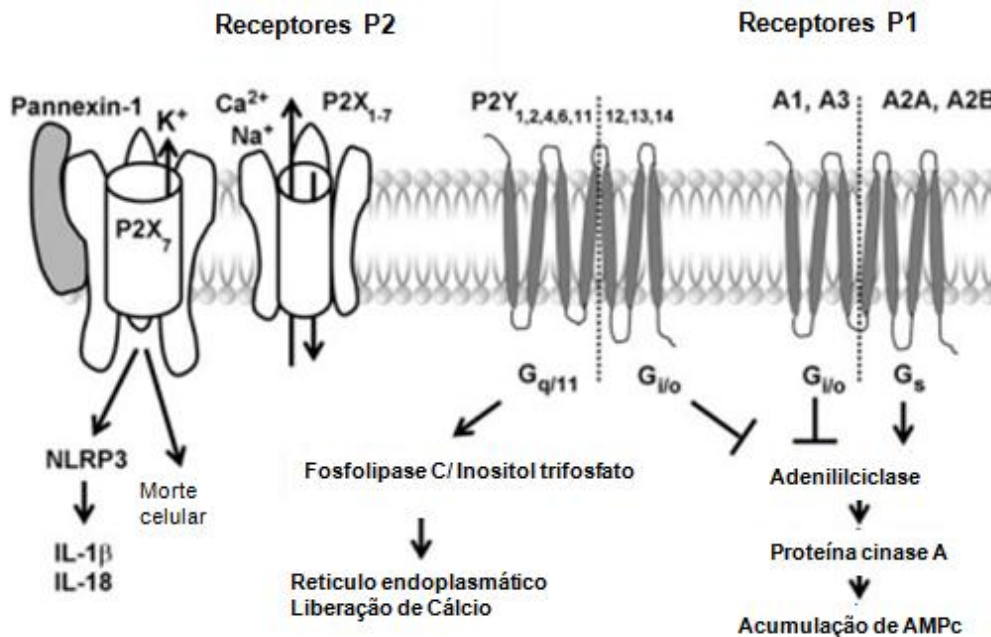


Figura 6: Estrutura dos receptores P1, P2Y e P2X (Adapatado de Stagg e Smyth, 2010).

1.6.2 Ectonucleotidases

Os nucleotídeos liberados para o meio extracelular são hidrolisados até seus nucleosídeos correspondentes através da ação catalítica das ectonucleotidases (Yegutkin, 2008), as quais são enzimas associadas à membrana plasmática com o sítio ativo voltado para o meio extracelular ou associadas às membranas intracelulares com o sítio ativo voltado para o lúmen. A família das ectonucleotidases é constituída pelas ENTPDases (ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases), ENPPs (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases), fosfatase alcalina e ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Zimmermann, 2001).

Todos os membros da família das ENTPDases apresentam em comum na sua estrutura, cinco domínios denominados de regiões conservadas de apirase (ACR), que estão diretamente envolvidos na atividade catalítica da enzima e/ou na integridade estrutural das mesmas (Handa et al., 1996). Essas enzimas hidrolisam nucleosídeos tri e di fosfatados até seus respectivos nucleosídeos

monofosfatados e sua atividade catalítica é dependente de cátions divalentes tais como: Ca^{2+} e Mg^{2+} (Lavoie et al., 2004; Vorhoff et al., 2005). Até o momento, 8 membros dessa família de enzimas foram identificados, sendo que as ENTPDases 1, 2, 3 e 8 possuem seu sítio catalítico voltado para o espaço extracelular (ectoenzimas), ENTPDases 5 e 6 são encontradas intracelularmente podendo sofrer secreção após expressão heteróloga e as ENTPDases 4 e 7 são localizadas intracelularmente com seus sítios ativos voltados para o lúmen de organelas citoplasmáticas, sendo portanto também consideradas ectoenzimas (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2005, 2006) (Figura 7).

Essas enzimas hidrolisam uma variedade de nucleosídeos di e tri fosfatados, e a preferência pelo substrato é diferente para cada enzima. As ENTPDases 1, 2, 3 e 8 possuem uma razão de hidrólise ATP/ADP de aproximadamente 1:1; 30:1; 3:1; 2:1, respectivamente (Zimmermann, 2001).

A etapa final de transformação do ATP em adenosina é catalisada pela ecto-5'-nucleotidase/CD73, a qual consiste de 2 subunidades glicoprotéicas, apresentando o zinco e outros íons metálicos divalentes ligados ao domínio N-terminal e estando ancorada na membrana plasmática através de uma âncora lipídica de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Zimmermann, 1992). A ecto-5'-nucleotidase/CD73 representa a principal enzima responsável pela formação de adenosina a partir de AMP no meio extracelular, portanto o controle da sua atividade enzimática é essencial para a manutenção de níveis adequados desse nucleosídeo e, conseqüentemente, dos efeitos mediados via receptores P1 (Zimmermann, 2001). Entretanto essa enzima, não regula apenas a cascata de sinalização purinérgica, mas também está envolvida em mecanismos de adesão entre células e adesão entre células e a matriz extracelular, bem como em mecanismos que levam a migração celular (Airas et al., 1997). Curiosamente, a ecto-5'-NT/CD73 é co-expressa com a NTPDase1/CD39 na superfície das células Treg CD4+/CD25+/Foxp3+, sendo um importante componente da maquinaria imunossupressiva, via geração de adenosina, molécula de ação anti-inflamatória que inibe a produção de citocinas e a

proliferação das células T (Kobie et al., 2006; Deaglio et al., 2007). Tais habilidades tornam a ecto-5'-NT/CD73 um alvo interessante de investigação e de intervenção farmacológica na inflamação.

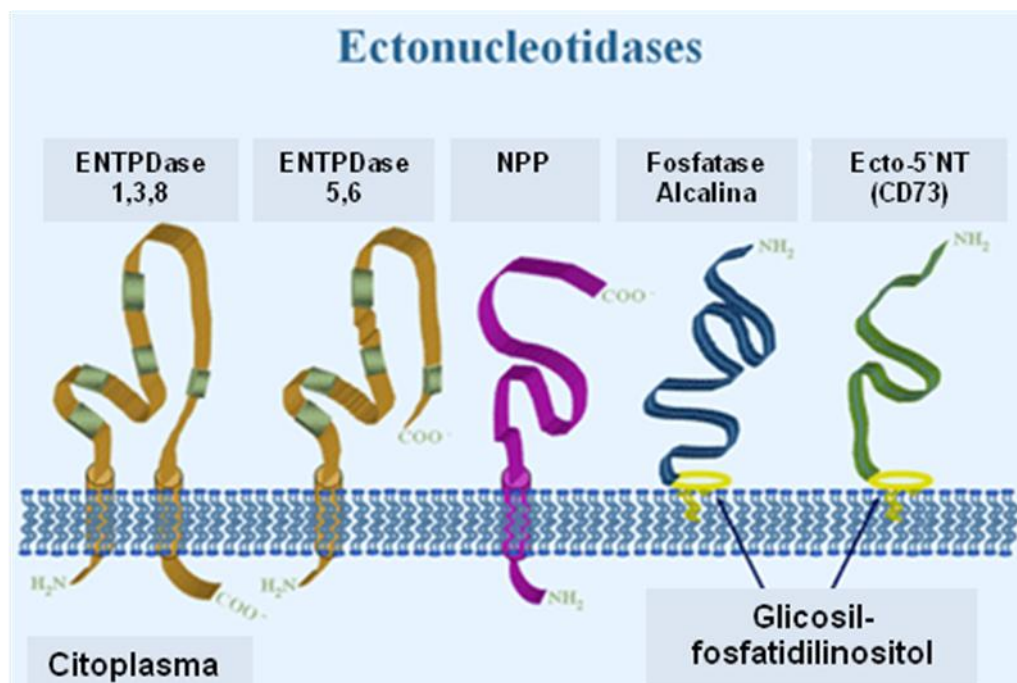


Figure 7: Estrutura das diferentes ectonucleotidases (Adaptado de www.ccri.ca/sevigny.html)

1.7 Ectonucleotidases, Gliomas e Inflamação

Em estudos prévios foi mostrado que as células de glioma apresentam um comportamento oposto ao observado nas células normais do sistema nervoso central, os astrócitos, uma vez que as células tumorais apresentam uma alta atividade AMPásica e baixa atividade ATPásica, com isso parece favorecer o acúmulo de ATP, que leva a morte do tecido normal e induz proliferação celular em diferentes linhagens de glioma e de adenosina, a qual induz angiogênese e imunossupressão (Wink et al., 2003; Morrone et al., 2005; Bavaresco et al., 2008). Em experimentos utilizando o modelo de implante de glioma in vivo em cérebro de ratos, nós mostramos que a co-injeção de células tumorais com apirase, um “scavenger” de ATP com características cinéticas similares a ENTPDase1, resultou em diminuição do volume tumoral a qual foi acompanhada de decréscimo de infiltrado inflamatório e de angiogênese (Morrone et al., 2006). Por outro lado, recentemente nós observamos que a

restauração da atividade da ENTPDase2, ecto-ATPase majoritária em astrócitos, resultou em aumento dramático do volume e da malignidade do glioma implantado (Braganhof et al, 2009). Esses resultados antagônicos e surpreendentes revelam que a interação gliomas-purinas é complexa e que o metabolismo diferencial de nucleotídeos extracelulares pode modular quali/quantitativamente a ativação dos receptores P1 e P2 e, dessa forma, desencadear efeitos totalmente opostos. Estudos sugerem que a modulação da inflamação pelo sistema de sinalização purinérgica é componente determinante entre os efeitos pró-tumoral/anti-inflamatório e antitumoral/pró-inflamatório observados nos macrófagos e torna esses sistemas de sinalização alvo de interesse de estudo.

2. OBJETIVO GERAL

Considerando que o processo inflamatório está diretamente associado com a malignidade dos gliomas e que o ATP e a adenosina podem contribuir para a resposta inflamatória pró-tumoral, nós hipotetizamos que os dois sistemas poderiam estar interagindo e resultando em estímulo aberrante da resposta inflamatória com conseqüente progressão tumoral. Com base nessa idéia, o objetivo geral do presente trabalho foi investigar as ectonucleotidasas em macrófagos após a exposição ao meio condicionado de gliomas.

2.1 Objetivos específicos

a) Avaliar a secreção de citocinas pró/anti-inflamatória pela cultura primária de macrófagos peritoneais de camundongos na presença e na ausência de meio condicionado de cultura de linhagem de glioma de camundongo (GL261);

b) Avaliar o efeito do meio condicionado da linhagem de células de glioma de camundongo (GL261) sobre a indução do fenótipo antitumoral (M1) ou pró-tumoral (M2) de macrófagos peritoneais em cultura primária;

c) Avaliar a expressão e atividade das ectonucleotidasas de macrófagos peritoneais de camundongos em cultura primária expostos ao meio condicionado de linhagem de glioma de camundongo (GL261).

3. RESULTADOS

3.1 Os resultados dessa dissertação e os materiais e métodos utilizados para sua obtenção foram organizados na forma de um manuscrito a ser submetido à revista Purinergic Signalling:

**GLIOMA CONDITIONED MEDIUM INDUCES MACROPHAGES TO
M2-LIKE PHENOTYPE AND ALTERS CYTOKINES RELEASE: EVIDENCE
FOR PURINERGIC SYSTEM INVOLVEMENT**

**GLIOMA CONDITIONED MEDIUM INDUCES MACROPHAGES TO M2-LIKE
PHENOTYPE AND ALTERS CYTOKINES RELEASE: EVIDENCE FOR
PURINERGIC SYSTEM INVOLVEMENT**

*Letícia Scussel Bergamin^a, Elizandra Braganhof^c, Fabrício Figueiró^a, Jean Sévigny^d, Cristina Bonorino^e, Rafael Fernandes Zanin^e, Ana Maria Oliveira Battastini^{a,b} **

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Brasil.

^bDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^cCentro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

^dCentre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (Pavillon CHUL); and Département de Microbiologie-Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada.

^eInstituto de Pesquisas Biomédicas, Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

**Corresponding Author:
Ana Maria O. Battastini
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, UFRGS,
Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo
90.035-003, Porto Alegre, RS, Brasil
Phone: +55 (51) 3308.5554
FAX: +55 (51) 3308.5535
E-mail: abattastini@gmail.com*

ABSTRACT

Gliomas are the most common brain tumors. The progression of malignant tumors involves the participation of an inflammatory microenvironment. Extracellular nucleotides modulate a variety of biological actions via purine receptors. ATP can act as danger signaling whereas adenosine, acts as a negative feedback mechanism to limit inflammation. Herewith we investigate if the exposition of macrophage cells to conditioned medium of GL261 (GL-CM) cell cultures modulates macrophage differentiation as well as the ectonucleotidase activities. The involvement of purine receptors in the secretion of cytokines by macrophages was also investigated. Macrophages exposed to GL-CM exhibit decreased iNOS activity, release low levels of the pro-inflammatory cytokine TNF- α and IL-12 and high levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The expression of genes FIZZ1 and Ym1 was increased too. The hydrolysis of ATP, ADP and AMP was decreased in macrophages stimulated with GL-CM. Flow cytometry and Real Time-PCR analysis showed a significant changed in NTPDase 2 and NTPDase 3 protein and mRNA expression of NTPDase 1 and ecto-5'-NT/CD73, respectively. There was also an increase in IL-6, IL-10 and MCP-1 secretion by macrophages exposed to GL-CM. This effect was reversed by suramin, indicating the participation of ATP in the secretion of these cytokines. In conclusion, macrophages exposed to glioma conditioned medium showed a polarized to M2-like (TAM) phenotype, which were accompanied by a decrease in the nucleotide hydrolysis, providing further evidence for the involvement of the extracellular nucleotide hydrolysis in the inflammatory process associated to tumor progression.

Key word: glioma, conditioned medium, macrophages, purinergic system

INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme is the most common and devastating primary brain tumor [1]. The tumor microenvironment is heterogeneous, comprised mainly by neoplastic cells in proliferation and immune cells such as lymphocytes, neutrophils and macrophages [2]. Although the function of immune cells in tumors is not completely elucidated, evidence suggests that the presence of leukocytes in the tumor microenvironment is an indispensable component in the processes of proliferation, migration and cell survival [3]. In gliomas, the inflammatory infiltration is directly correlated with the degree of malignancy of tumor [3].

Macrophages exhibit a spectrum of activation ranging from M1/pro-inflammatory to M2/anti-inflammatory phenotypes [4]. Distinct macrophage populations have been related to cancer inhibition or progression [5]. In general, an antitumor effect has been described to M1-macrophages, which are characterized biochemically by increased nitric oxide (NO) production and tumor-killing actions, while M2-macrophages exhibit an opposite effect, showing increased arginase activity and promoting tumor growth and angiogenesis [6,7]. Previous studies have shown that tumor associated macrophages (TAM) reflect an M2-like phenotype, in contrast to the M1 phenotype [7,8]. TAM also exhibits a reduced ability to present antigens and inhibit tumor-specific immunity by creating an immunosuppressive environment enriched in IL-10, CCL17 and CCL22 [9]. In addition, TAM express and secrete a number of substances that promote angiogenesis such as VEGF, GM-CSF, MCP-1, TGF- β and IL-8/CXCL8 and enhance tumor cell migration and invasion, through the

expression of enzymes such as matrix metalloproteinases (MMP) that degrade the matrix of central nervous system, favoring the tumor migration in the brain parenchyma [9]. Therefore, by modulating multiple signaling pathways closely related to tumor malignancy, TAM are considered key elements in the tumorigenesis processe and a better understating about their phenotype modulation by tumor cells is essential to develop more efficient therapeutic strategies target to gliomas.

The control of the inflammatory response is extremely important for the maintenance of biological functions. High extracellular nucleotide levels (e.g. ATP, UTP) are released into the extracellular medium due to cell damage, hypoxia or mechanical stress [10]. ATP and other nucleotides act in neurotransmission, neuromodulation, immune response, traffic control leukocytes from the blood into the tissues, platelet aggregation and alert the immune system to cell damage/injury [11,12]. Biological effects of extracellular nucleotides/nucleosides are evoked by activating transmembrane receptors of the P2 and P1 family [13]. ATP mediated cell communication is controlled by ectonucleotidases, such as ectonucleoside-triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) [14]. The NTPDases efficiently hydrolyze nucleoside 5'-triphosphates and diphosphates to its respective nucleoside-5'-monophosphate with considerable difference in their preference for individual type of nucleotide [14]. The ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73) generates adenosine from AMP [14]. Adenosine acts by mediating an immunosuppressive response to protect adjacent tissues to inflammation of the attacks promoted by the defense cells [15]. Previous study demonstrated that glioma cell lines have altered extracellular ATP, ADP, and AMP catabolism, showing low rates of

extracellular ATP hydrolysis and high rates of extracellular AMP hydrolysis when compared to astrocytes in culture [16]. As ATP is poorly hydrolyzed by glioma cells, it could potentially accumulate in the tumor periphery resulting in glioma cell proliferation and neuronal toxicity [16-18]. Moreover, extracellular ATP in glioma cells increases the release of the pro-inflammatory factors MCP-1 and IL-8, important for the recruitment of monocytes to the tumor area [19]. So, a dysfunction in the purinergic system can facilitate the development of cancer [20].

The aim of this study was to determine whether the exposure of macrophage cells to conditioned medium from glioma cells modulates the phenotype of macrophages, the activity of ectonucleotidases macrophages and the involvement of purinergic system on cytokines secretions.

MATERIALS AND METHODS

Animals

CF1 male mice, 6-8 weeks, were maintained under a standard dark–light cycle (lights on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.) at room-controlled temperature (22 ± 2°C). The mice had free access to chow and water. All procedures used in the present study followed the “Principles of Laboratory Animal Care” from National Institutes of Health (NIH) and were approved by the Ethical Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS) under the registration 18128.

GL261 cell cultures and preparation of glioma conditioned medium

Mouse GL261 glioma cell line was a generous gift of Doctor Steve Lacroix, Department of Anatomy and Physiology, Laval University, Qc, Ca. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, (Gibco BRL, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, CA, USA). Cell cultures were maintained in 5% CO₂/95% air at 37°C. To prepare the glioma conditioned medium, GL261 cells were seeded at density 100000 cells/well in 6 multiwell plates and the conditioned medium (GL-CM) was obtained by incubating subconfluent glioma cultures with DMEM 10% FBS for 24h (GL-CM_{24h}), 48h (GL-CM_{48h}) or 72h (GL-CM_{72h}). The culture supernatant was collected, centrifuged (1000 g – 10 min) and transferred to a new falcon and stored at - 80°C until use.

Mouse peritoneal macrophage cultures

Mouse peritoneal macrophages were collected by lavage of the peritoneal cavity with 5 mL of sterile FBS-free DMEM culture medium. The cells were centrifuged and suspended in FBS-free DMEM medium and the obtained cells were seeded in 6, 24 or 48 multiwell plates at densities of 10×10^4 , 5×10^4 or 3×10^4 cells/well in a final volume of 1000 μ L, 500 μ L or 250 μ L of culture medium, respectively. Macrophages were allowed to attach for 30 min and after that unattached cells were washed out with FBS-free DMEM. The attached cells, mainly peritoneal macrophages, were used for the experiments thereafter. Macrophages were evaluated by microscopic examination, indicating

macrophage purity higher than 80%, which was confirmed by FACS using the CD11b Ab PE (BD Phamingen) (data not shown).

Macrophage exposition to GL261 conditioned medium

The obtained macrophages were exposed to the GL-CM_{24h}, GL-CM_{48h} or GL-CM_{72h} for 24h. Control cultures were macrophages exposed to DMEM 10% FBS (resident macrophages). In experiments to evaluate the participation of P2 receptors on macrophage cytokine release, cultures were exposed to GL-CM_{24h}, GL-CM_{48h} or GL-CM_{72h} for 24h in presence or absence of apyrase (2U/well; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or suramin (100 μ M; Sigma-Aldrich).

Arginase and iNOS activity

Arginase activity in cell lysates was measured based on the conversion of L-arginine to L-ornithine and urea according to the technique described by Corraliza and collaborators with minor modifications [21]. Briefly, cells were lysed for 15 min with 100 μ L of 0.1% Triton-X-100. Then, 100 μ L of Tris-HCl (pH 7.4) and 10 μ L of 10 mM MnCl₂ were added. 100 μ L of the mixture were removed and placed in an eppendorff and the enzyme was heat-activated (56°C-7 min). The enzyme reaction was started by adding 100 μ L of 0.5 M L-arginine (pH 9.7) as substrate and the mixture was incubated for 1h at 37°C. The reaction was stopped by adding 90 μ L of H₂SO₄ (96%), H₃PO₄ (85%), H₂O (1/3/7, v/v/v). The urea concentration was measured at 540 nm after the

addition of 40 μ L of α -isonitropropiophenone 6%, followed by heating at 95°C for 30 min. The values were compared with the standard curve of urea.

Nitrite concentrations were measured using the Greiss reaction [22]. First, 200 μ L of cell supernatant was incubated with 100 μ L of 1% sulfanilamide and 100 μ L of 0.3% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride. Nitrite was quantified by ELISA reader 548 nm using sodium nitrite as standard.

Determination of cytokine release

Supernatants of control or GL-CM exposed macrophage cultures were analyzed by a CBA mouse inflammation kit (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α and IL-12p70; R&D Systems) by flow cytometry using a FACSCalibur (Beckton Dickinson) according to manufactures` s instructions.

Assay of ectonucleotidase activity

ATPase, ADPase and AMPase activities were evaluated in 48 well plates containing macrophages that were washed three times with incubation medium in absence of nucleotides. The enzymatic reaction was started by the addition of 200 μ L of incubation medium containing 2 mM CaCl₂ (for ATPase and ADPase assay) or 2 mM MgCl₂ (for AMPase assay), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM Hepes (pH 7.4) and 1 mM ATP, ADP or AMP as substrates, at 37°C. After an incubation of 10 min, an aliquot of the incubation medium were transferred to a pre-chilled tube containing trichloroacetic acid (final concentration 5% v/v). The release of inorganic phosphate (P_i) was

measured by the malachite green method [23], using KH_2PO_4 as a P_i standard. Controls to determine non-enzymatic P_i release were performed by incubating the substrate in the absence of the cells. The protein concentration was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard [24]. Specific activity was expressed as nmol P_i released/min/mg of protein.

Analysis of ATP and AMP metabolism by HPLC

The cells were incubated as described above, except that ATP concentrations were 100 μM . To stop the reaction, an aliquot of the incubation medium was transferred to a pre-chilled tube and centrifuged at 4⁰C for 30 min at 16000 g. Aliquots of 40 μL were applied to a reverse phase HPLC system using a C18 Shimadzu column (Shimadzu, Japan) with absorbance measured at 260 nm. The mobile phase was 60 mM KH_2PO_4 , 5 mM tetrabutylammonium chloride (pH 6.0) in 30% methanol [16]. Retention times were assessed using standard samples of nucleotide and their metabolites. The non-enzymatic hydrolysis of the ATP and AMP were consistently less than 5% and cells incubated in nucleotide-free buffer did not exhibit any detectable peak.

RT-PCR and Real Time PCR

The RNA was isolated using the TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Approximately 1 μg of total RNA were added to each cDNA synthesis reaction using the SuperScript-III RT pre-amplification system

(Invitrogen). The PCR reactions were performed in 25 μ L of the reaction mixture containing 1 μ L cDNA, 10nmol of the primer in the supplied PCR mix buffer (Platinum PCR Supermix, Invitrogen). After initial denaturation for 5 min at 95°C, the amplifications were carried out for 35 cycles of denaturation at 94°C for 45s, annealing at primer specific temperature for 45s and extension at 72°C for 45s. The PCR was ended by 7 min incubation at 72°C. The same program was used for the amplification of the gene of reference, which was β -actin. Sequences of primers are listed in Table 1. The PCR products were separated in 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized with SYBRGold (Molecular Probe).

Real-time PCRs were carried out in the Applied-Biosystem Step One Plus cycler using Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Total RNA and cDNA were generated, as described in RT-PCR analysis. The selected primers used for real time PCRs were the same used in RT-PCR analysis. All results were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [25]. The β -actin was used as the internal control gene for all relative expression calculations.

Flow Cytometry

The expression of selected surface proteins by peritoneal macrophages was evaluated by flow cytometry using the following antibodies (Ab): guinea pig polyclonal anti-mouse NTPDase1/CD39 (mN1-1_c (I₄, I₅)), rabbit polyclonal anti-mouse NTPDase2 (mN2-36_L), guinea pig anti-mouse NTPDase3 (mN3-1_cI₄) and rabbit anti-rat ecto-5'-nucleotidase/CD73 (rNu 9_L, I₄,5), anti-CD11b PE (BD

Phamingen). Briefly, the cells were incubated for 30 min with the above primary Ab diluted in PBS, 1% FBS, 0.1% sodium azide (PFA) and, when necessary, with secondary FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (Invitrogen) or Alexa 488-conjugated goat anti-guinea pig IgG Ab (Invitrogen) for 30 min, with a minimum of two washes with PFA after each incubation. Cell surface fluorescence was measured in FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences).

Statistical analysis

The results were presented as mean \pm SD (standard deviation). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test. The differences between the means were considered significant for P values <0.05 .

RESULTS

Characterization of macrophages activation following glioma conditioned medium exposure

Mouse peritoneal macrophages were exposed to GL-MC_{24h}, GL-CM_{48h} or GL-CM_{72h} by 24h in culture and the macrophage activation was characterized by evaluating iNOS and arginase activities, Ym1 and FIZZ1 mRNA expression and cytokine release (Fig. 1). It was observed a significant decrease in NO production (87%) by macrophages exposed to GL-CM_{72h}. In contrast, when the macrophages were exposed to GL-CM_{24h} and GL-CM_{48h} there was no difference in relation to the control cells (Fig 1a). The arginase activity was

increased only when macrophages were exposed to GL-CM_{24h} (Fig. 1b). The expression of YM1 and FIZZ1, two important markers of a M2 phenotype, increased significantly in macrophages exposed to GL-CM_{72h} when compared to the control (Fig. 1c). Notably, our results showed that macrophages exposed to GL-CM_{24h}, GL-CM_{48h} and GL-CM_{72h} presented an increased release of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, when compared to control macrophages (Fig. 1d). In contrast, macrophages produced less TNF- α and IL-12, two pro-inflammatory cytokines (Fig. 1e, f). It is important to note that the GL261 glioma cells exposed to DMEM 10% FBS for 24, 48 or 72h did not secrete detectable levels of analyzed cytokines (data not shown). The cytokines released are important to characterize macrophages phenotype (e.g. TNF- α as pro-inflammatory cytokine/M1 and IL-10 as anti-inflammatory cytokine/M2) [26]. Taking together, the presented results indicate that macrophages are modulated to M2-like phenotype, when exposed to conditioned medium obtained from glioma cells (GL-CM).

Glioma conditioned medium modulates extracellular ATP metabolism in macrophage cultures

Ectonucleotidase activities constitute an important mechanism for controlling the purinergic receptor activation [14]. The influence of GL-CM_{24h}, GL-CM_{48h} or GL-CM_{72h} on nucleotide metabolism of glioma cells was then evaluated. The ATP hydrolysis was decreased around 32% and 42% in macrophages exposed to GL-CM_{48h} or GL-CM_{72h}, respectively, when compared to control macrophages. The ADP hydrolysis was decreased in 63% only by

macrophages exposed to GL-CM_{72h} and the AMPase activity was reduced by all GL-CM (Fig. 2a). These results were also analyzed by HPLC. Figure 2b shows that when the macrophages were exposed to GL-CM_{72h}, ATP was slower metabolized along the 60 min incubation, in comparison to control macrophages, accumulating around 60% of ATP in the end of the reaction (Fig. 2b). In contrast, control macrophages converted ATP to ADP and AMP, which is in according to its higher ATPase activity. To better characterize the alterations in the ATP metabolism in macrophages exposed to GL-CM_{72h}, the expression of NTPDase1, 2 and 3 and ecto-5'-NT/CD73 was evaluated by flux cytometry applying specific antibodies [27]. As shown in Figure 2c, there was a decrease in the protein expression of NTPDase2, 3 and ecto-5'-NT/CD73 in macrophages exposed to GL-CM_{72h} when compared to control cells. Finally, we investigated whether GL-CM_{72h} was able to reduce the level of mRNA expression of these enzymes. The mRNA was isolated from cell cultures and it was analyzed by Real Time PCR. The results demonstrated that, there is a significant reduction in NTPDase1 and an increase in ecto-5'-NT mRNA expression. The expression of NTPDase2 and 3 was unchanged (Fig. 2d).

Secretion of cytokines by macrophages exposed to GL-CM_{24h}, GL-CM_{48h} or GL-CM_{72h}

Recent studies have shown that changes in ATPase activity seem to favor the ATP accumulation within glioma parenchyma, resulting in tumor proliferation and neurotoxicity [16, 17]. To understand the functional relevance of decreased ATP metabolism exhibited by macrophages exposed to GL-CM

and the consequent modulation of purinergic receptor activation, we investigated whether ATP would be involved in the secretion of IL-6, IL-10 and MCP-1 by the addition of apyrase (an ATP/ADP scavenger) or suramin (a non-specific purinergic receptor antagonist). We found that macrophages exposed to GL-CM_{24h}, GL-CM_{48h} or GL-CM_{72h} had a higher secretion of IL-6, MCP-1 and IL-10 when compared to control macrophages or GL261 (Fig. 3). Notable, the control (macrophages exposed to DMEM 10% FBS) presented reduced cytokine production (IL-6: $58 \pm 8,5$ pg/mL; IL-10: $120,5 \pm 38,89$ pg/mL; MCP-1: $21,00 \pm 11,31$ pg/mL) (data not shown). Consistent with the P2 receptors participation in the cytokine release by macrophage exposed to GL-CM, suramin decreased significantly the IL-6, MCP-1 and IL-10 release when compared to control macrophages or GL-CM (Fig. 3a, b, c). Finally, it was observed a tendency to diminish the production of cytokines by the addition of apyrase to the conditioned medium.

DISCUSSION

The present study demonstrated that the macrophages exposed to GL-CM are modulated to a phenotype M2-like and altered the metabolism of adenine nucleotides. These results are consistent with literature data that showed that TAM have a low expression of IL-12 and up regulated levels of M2-specific genes, such as arginase-1 (Arg-1), Fizz1, and Ym1 [28-30]. Macrophages exposed to GL-CM exhibits decreased iNOS activity, release low levels of the pro-inflammatory cytokine TNF- α and IL-12, high levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The expression of genes FIZZ1 and Ym1 was

increased too (Fig. 1). Taking together, these results demonstrated that macrophages treated with GL-CM were differentiated into M2-like phenotype. Accumulating evidence points that the creation of an immunosuppressive environment and the phenotype modulation of immune cells by the tumor constitute key elements of glioma progression [2,26]. However, signaling pathways involved in the tumor and immune cell crosstalk are poor known [2,26]. Considering that extracellular nucleotides, as ATP, act as endogenous signaling molecules of damage/lysis cellular and high levels are found in sites of inflammation and tumors [18, 31], we hypothesized that purinergic signaling, comprised by receptors and ectonucleotidases, may be involved in the modulation of TAM, and then, contribute to immune escape of gliomas. To test this hypothesis, we investigated the profile of nucleotide hydrolysis in macrophages exposed to glioma conditioned medium. Our results demonstrated a decrease in ATPase, ADPase and AMPase activities (Fig. 2a, b), suggesting a less ATP breakdown and consequent ATP accumulation in the extracellular milieu. Considering that, this nucleotide promotes tumor proliferation and death of normal neuronal tissue, we previously hypothesized that ATP may be related to tumor progression [16,17]. In the present work we show that macrophages were modulated to a M2-phenotype would contribute to the increased presence of ATP around the glioma cells, which could be related to the tumor promoting effects of TAM. This can be agreed by previous results obtained in our group, which we show that co-injection of apyrase (a similar ENTPDase1) with tumor cells in a model implant of glioma in rat brain resulted in the decrease tumor volume. Of note, inflammatory infiltrate and angiogenesis were markedly decreased [32].

The reduced nucleotide hydrolysis in macrophages that were treated with GL-CM is consistent with the decreased level of ectonucleotidases observed (Fig 2c). In contrast, an increase in ecto-5'-NT mRNA expression and reduction in NTPDase1. The expression of NTPDase2 and 3 was unchanged the mRNA expression (Fig. 2d). The mechanism that could explain the down-regulation of enzyme activities and at the same time up-regulation of transcriptional levels is known as feedback autoregulatory loop [33] and could be explained as a compensatory mechanism of the cells, to try to restore the enzymatic protein in the cells surface in order to produce more adenosine. These findings should be further investigated in future experiments.

TAM are reported to secrete factors that suppress immune cells, such as IL-10, IL-4, IL-6, and MCP-1 [19, 34, 35]. These cytokines may promote an M2-like phenotype and/or suppress the M1 macrophages [35]. So, we investigated the production of IL-6 and MCP-1 by macrophages exposed to GL-CM and with the addition of suramin or apyrase. We verified that IL-6, MCP-1 and IL-10 were increased in the presence of GL-CM in relation of control or glioma cells (Fig. 3a, b, c). The addition of suramin in GL-CM led to a decrease in IL-6 and MCP-1 (Fig. 3a, b) while the addition of apyrase led to a tendency to decrease these cytokines. These results are according with Jantaratnotai and collaborators that showed that the addition of apyrase and P2 receptor antagonist decreased MCP-1 in C6 glioma cells whereas the ATP addition leads to an increase of production of MCP-1 [19] and reinforce a possible relationship between the purinergic system and cytokine production by macrophage associated tumors.

In conclusion, the results presented here demonstrate that macrophages exposed to GL-CM showed a polarized profile to TAM/M2-like, which were

accompanied by a decrease in the nucleotide hydrolysis, providing further evidence for the involvement of the NTPDases and ecto-5'-nucleotidase in tumor progression.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the CNPq-Brasil. L Bergamin and F Figueiró were recipients of CNPq fellowships and J Sévigny of a Junior 2 scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. The authors thank L.R. Blazina and M. Pugliese for their technical assistance.

REFERENCES

- [1] Dai C, Holland EC (2001) Glioma models. Biochim Biophys Acta: Reviews on Cancer 1551: M19-M27*
- [2] Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P (2009) Tumor-associated macrophage (TAM) as major players of the cancer related inflammation. J Leukoc Biol 86:1065-1073*
- [3] Watters JJ, Schartner JM, Badie B (2005) Microglia function in brain tumors. J Neurosci Res 81:447–455*
- [4] Gordon S (2007) The macrophage: past, present and future. Eur J Immunol 37:S9-S17*
- [5] Sica A, Bronte V (2007) Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. J Clin Invest 117:1155–1166*

- [6] Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophages activation. *Nature Reviews Immunol* 8:958-969
- [7] Coussens IM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420: 19–26
- [8] Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545
- [9] Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature* 11:723-737
- [10] Verkhrasky A, Krishtal O, Burnstock G (2009) Purinoceptors on Neuroglia. *Mol Neurobiol* 39(3):190-208
- [11] Burnstock G (2004) Introduction: P2 receptors. *Cur Top Med Chem* 4(8):793-803
- [12] Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112(2):358-404
- [13] Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97: 587-600
- [14] Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Develop Res* 52:44-56
- [15] Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M (2006) A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc USA* 103:13132-13137

- [16] Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku, AS, Schwartzmann G, Sarkis JJ, Battastini AMO (2003) Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Letters* 198(2):211-218
- [17] 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(2):135-1340
- [18] Pellegatti 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(7):2599- e2537
- [19] Jantaratnotai k, Choi HB, Mclarnon G (2009) ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells. *BMC Cancer* 9:442-452
- [20] White N, Burnstock G (2006) P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 27(4):211-217
- [21] Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174:231–235
- [22] Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells, *J Exp Med* 169:1543–1555
- [23] Chan K, Delfert K (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 157: 375-380
- [24] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 172:218-254.

- [25] 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
- [26] Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A (2008) The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Ver Oncol Hematol* 66:1-9
- [27] Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, Campesato LFI, Filho AZ, Moreira JCF, Morrone FB, Sévigny J, Schetinger MRC, Wyse ATS, Battastini AMO (2012) Differential macrophage activation alters the expression profile of *ntpdase* and *ecto-5'-nucleotidase*. *Plos One*
- [28] Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Bronte V, Pasqualini F (2006) A distinct and unique transcriptional programme expressed by tumor-associated macrophages: defective NF-kB and enhanced IRF-3/STAT1 activation. *Blood* 107:2112-2122
- [29] Ghassabeh G.H, De Baetselier P, Brys L, Noel W, Van Ginderachter JA, Meerschaut S, Beschin A, Brombacher F, Raes G (2006) Identification of a common gene signature for type II cytokine-associated myeloid cells elicited in vivo in different pathologic conditions. *Blood* 108:575-583
- [30] Mantovani A, Sica A (2010) Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 2:231–237
- [31] Bours MJL, dagnelie PC, Giuliani AL, Wesselius A, Di Virgilio F (2011) P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Front Biosci* S3:1443-1456
- [32] 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 23(6):226

[33] Krishna S, Andersson AM, Semsey S, Sneppen K (2006) Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. *Nucleic Acids Res 34(8):2455–2462*

[34] Mantovani A, Germano G, Marchesi F, Locatelli M, Biswas SK (2011) Cancer-promoting tumor-associated macrophages: New vistas and open questions. *Eur J Immunol 41:2470–2525*

[35] Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature 11:775-787*

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Characterization of macrophages activation following glioma conditioned medium exposure.

Glioma conditioned medium (GL-CM) was prepared by incubating GL261 glioma cells with DMEM 10% FBS for 24, 48 or 72 h. Then, mice peritoneal macrophages were exposed to DMEM 10% FBS (Control) or GL-MC24h, GL-CM48h or GL-CM72h by 24h in culture and the macrophage phenotype was evaluated as described in Material and Methods. (a) iNOS activity was estimated by the NO²⁻ (nitrite) accumulation in the supernatant of macrophage cultures. (b) Arginase activity was estimated by measuring the formation of urea from arginine in macrophage lysates. (c) FIZZ1 and Ym1 expression was evaluated by qPCR. Expression was normalized to β -actin signals. (d) IL-10 and (e) TNF- α (f) IL-12 cytokine release were measured from supernatant of

macrophages cultures by CBA, as described in Material and Methods. The values represent means \pm S.D of at least three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test. *Significantly different from the control group (C10%FBS) for $p < 0.05$.

Figure 2. Glioma conditioned medium modulates extracellular ATP metabolism in macrophage cultures.

(a) Macrophages were exposed to DMEM/10% FBS (control) or to GL-CM_{24h}, GL-CM_{48h} or GL-CM_{72h} for 24h and the ATP, ADP and AMP hydrolysis were evaluated as described in Material and Methods. Specific activity values were expressed as nmol Pi/min/mg protein. **(b)** Metabolism of extracellular ATP by macrophages after exposition to GL-CM_{72h} for 24h. Control and GL-CM_{72h} were incubated with ATP (100 μ M) in 200 μ l of incubation medium as described in Material and methods. An aliquot of the supernatant was with drawn at 0, 10, 30 and 60 min and the presence of ATP breakdown products were determined by HPLC. **(c)** Macrophages were exposed to DMEM/10% FBS (control) or to GL-CM_{72h} for 24 h and NTPDase1-3 and ecto-5'-NT/CD73 surface expression was evaluated by FACS using specific antibodies, as described in material and methods. % protein expression for NTPDase1, 2, 3 and ecto-5'-NT/CD73. **(d)** Macrophages were exposed to DMEM/10% FBS (control) or to GL-CM_{72h} for 24h and NTPDase1-3 and ecto-5'-NT/CD73 mRNA expression was evaluated by Real time PCR as described in Material and methods. Ectonucleotidase expression was normalized to β -actin signals and expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$. The values represent means \pm S.D. of three independent experiments. Data are

*analyzed by ANOVA followed by Tukey's test. * Significantly different from the respective control groups (C10%FBS) for $p < 0.05$.*

Figure 3. Secretion of cytokines by macrophages exposed to GL-CM_{24h}, GL-CM_{48h} and GL-CM_{72h}.

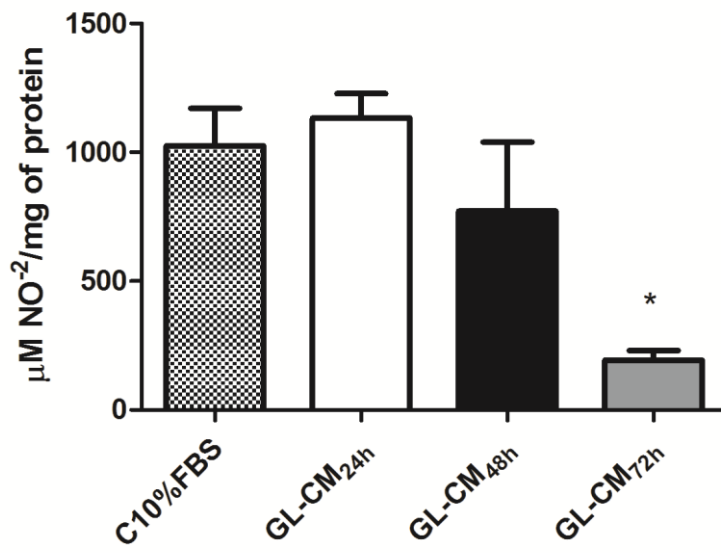
(a) IL-6 (b) MCP-1 and (c) IL-10 release was measured in the supernatants obtained from macrophage cultures exposed to GL-CM_{72h} for 24h in the presence or absence of apyrase (2 U/well) or suramin (100 μ M), described in material and methods. The values represent means \pm S.D. of three independent experiments. Data are analyzed using by ANOVA followed by Tukey's test. * Significantly different from GL261/24h, GL261/48h or GL261/72h and # Significantly different from GL-CM_{24h}, GL-CM_{48h} or GL-CM_{72h} ($p < 0.05$).

TABLE 1. PCR primers for ectonucleotidases.

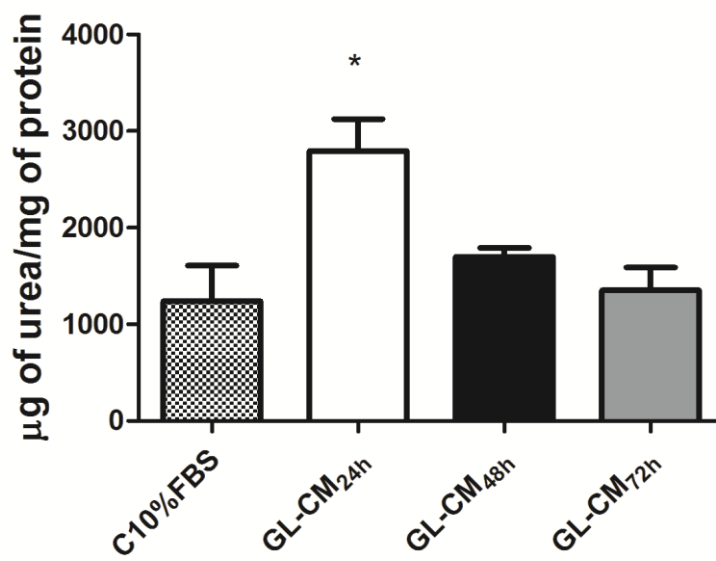
<i>Entpd1</i>	5`-AGCTGCCCCCTTATGGAAGAT-3`	5`-TCAGTCCCACAGCAATCAAAA-3`
<i>Entpd2</i>	5`-TTCCTGGGATGTCAGGTCTC-3`	5`-GTCTCTGGTGCTTGCCTTTC-3`
<i>Entpd3</i>	5`-ACCTGTCCCGTGCTTAAATG`-3`	5`-AGACAGAGTGAAGCCCCTGA-3`
<i>Nt5e</i>	5`-CAGGAAATCCACCTTCCAAA-3`	5`-AACCTTCAGGTAGCCCAGGT-3`
<i>β-actin</i>	5`- TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG-3`	5`-TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3`

Fig. 1

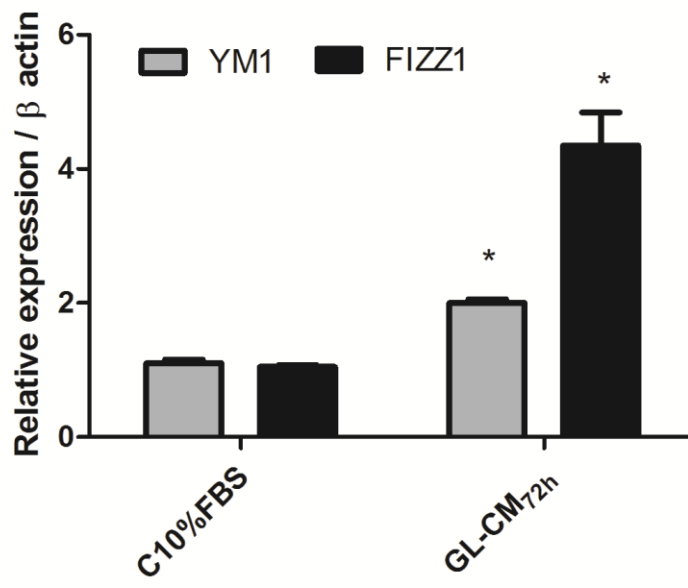
(a)



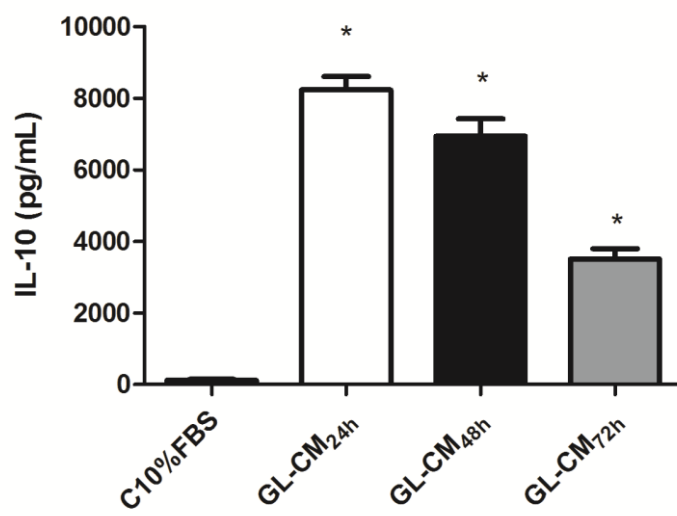
(b)



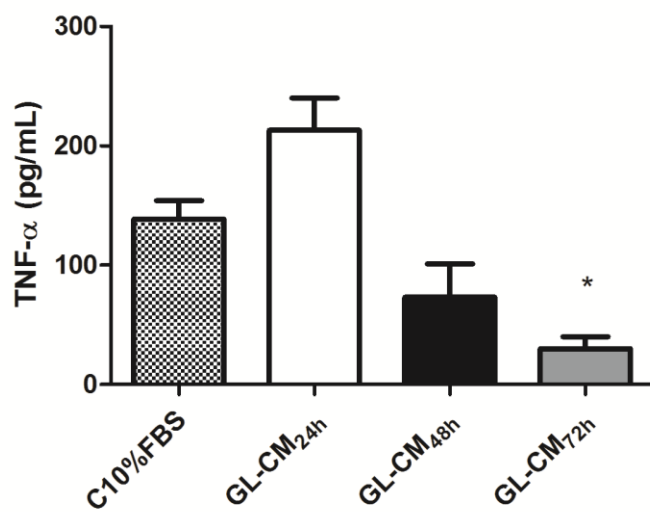
(c)



(d)



(e)



(f)

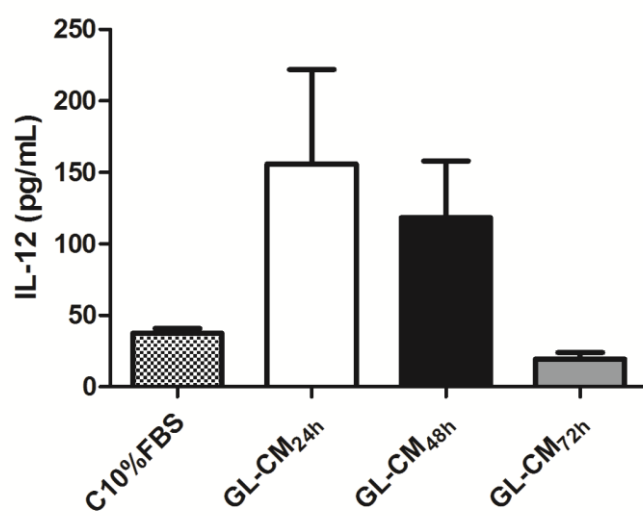
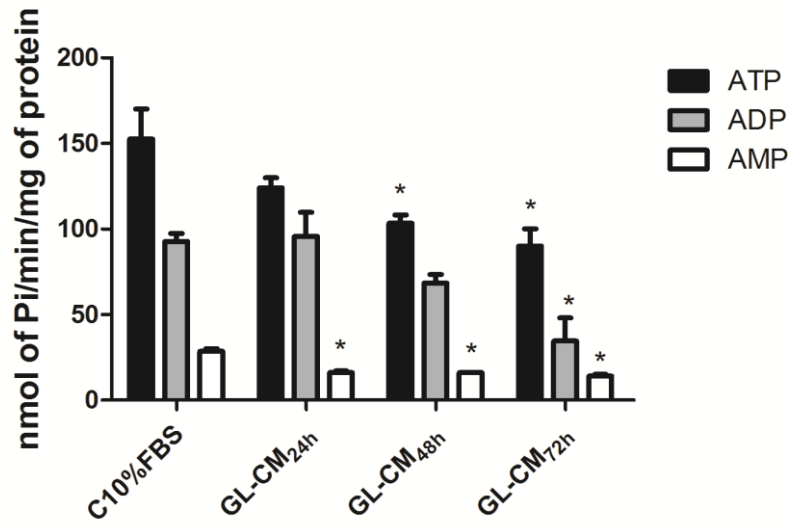
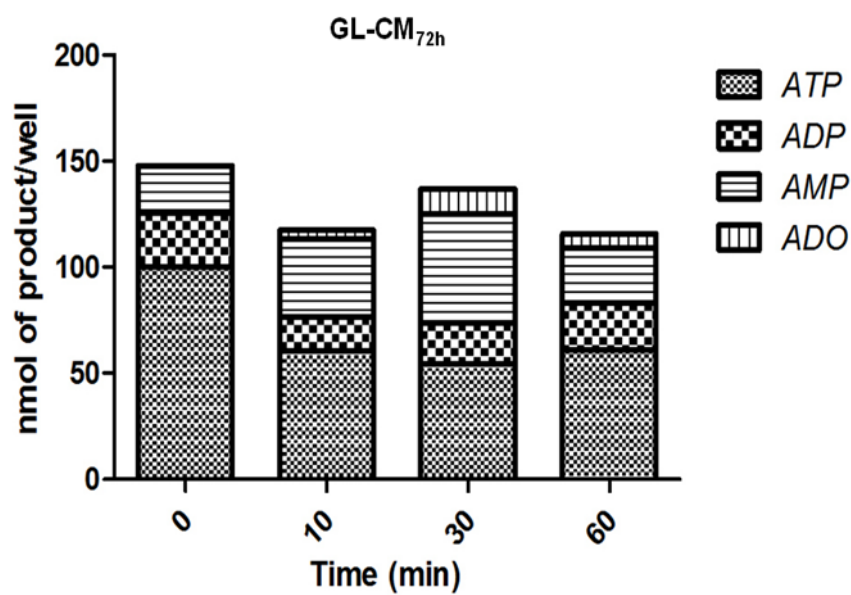
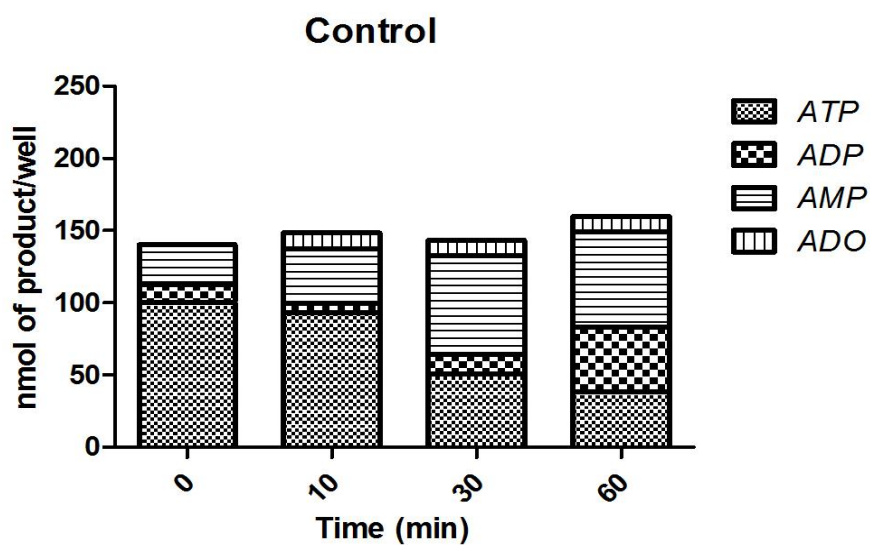


Fig. 2

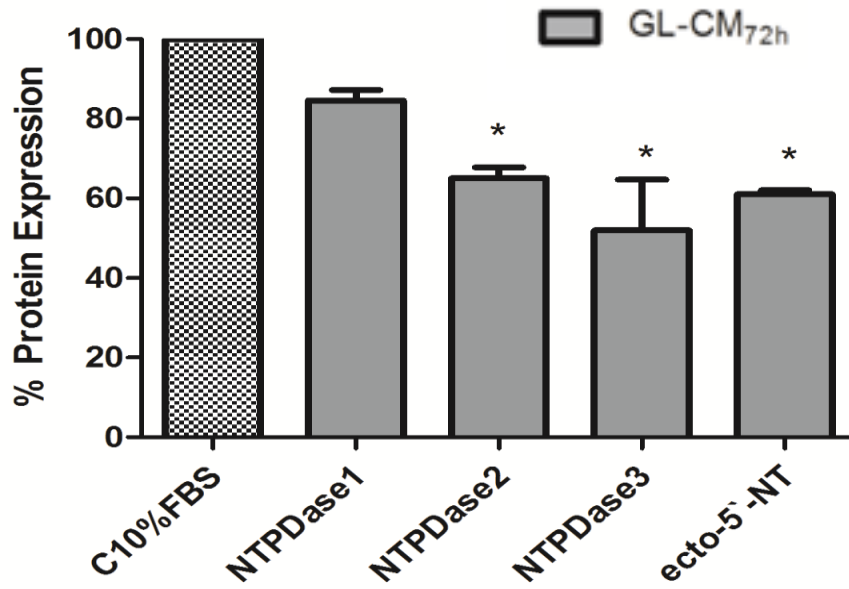
(a)



(b)



(c)



(d)

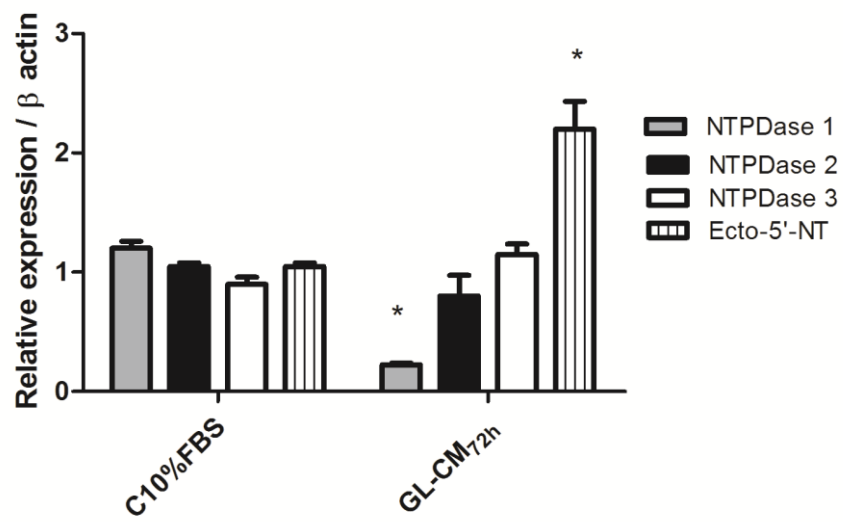
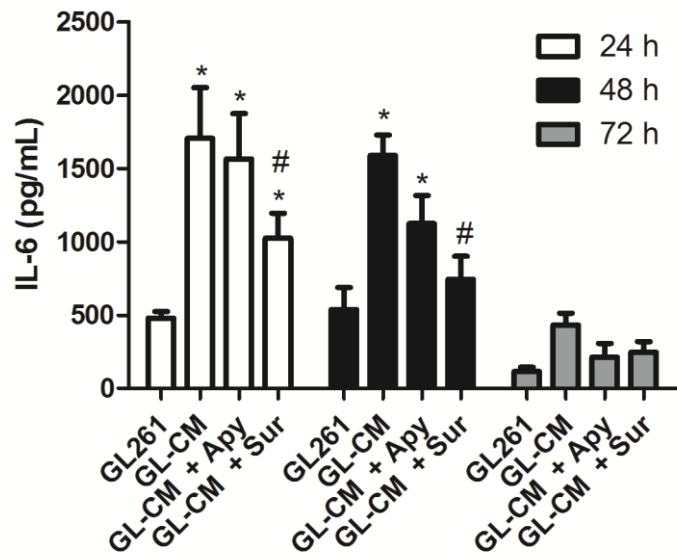
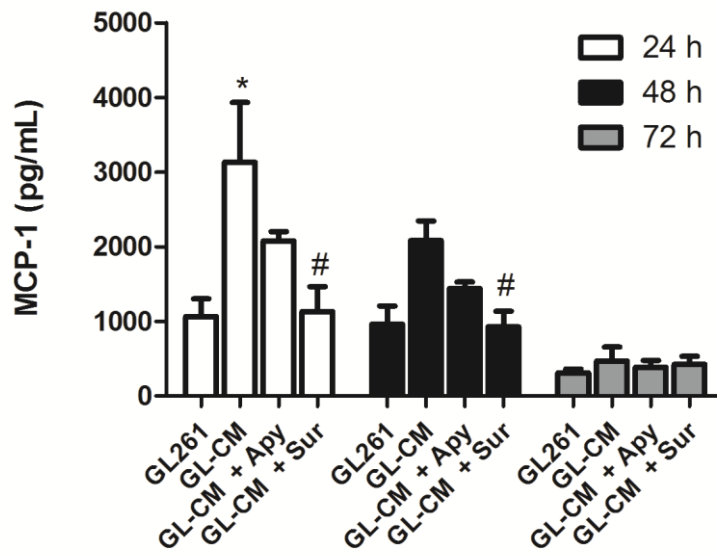


Fig. 3

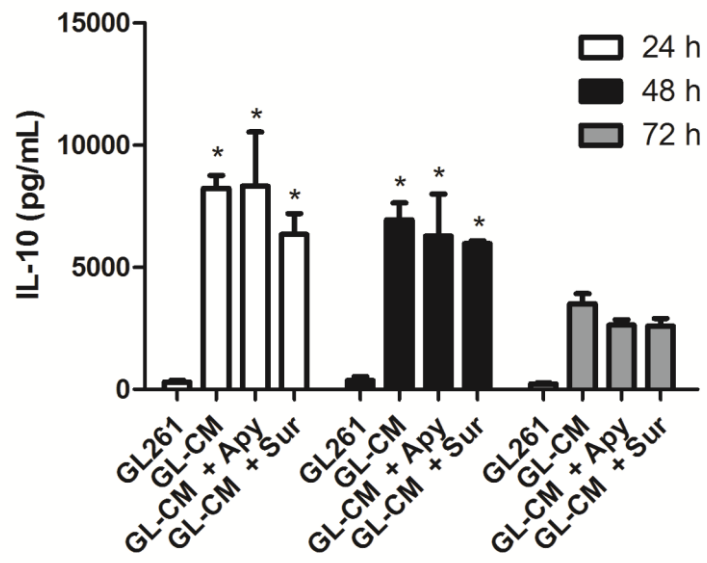
(a)



(b)



(c)



4. DISCUSSÃO

Os gliomas são o principal tipo de tumor que acomete o sistema nervoso central (Sathornsumetee et al., 2007). A incidência anual de pessoas que desenvolvem glioblastoma multiforme é de aproximadamente 5 casos para cada 100.000 pessoas e nos últimos vinte anos o número de pacientes diagnosticados com esse tipo de tumor aumentou significativamente, provavelmente pela melhora nos exames de imagem para o diagnóstico (Wen e Kesari, 2008). Embora muitos estudos tenham sido realizados para o tratamento desse tipo tumoral ainda não há nenhum protocolo completamente efetivo (Maher et al., 2001).

O microambiente tumoral contém muitas células não neoplásicas, como fibroblastos, células endoteliais e leucócitos. A maior parte desses leucócitos é composta por macrófagos (Pollard, 2004). Muitos estudos têm demonstrado o envolvimento dos macrófagos associados ao tumor (TAM) com a progressão tumoral (Komohara et al., 2008, Mora et al., 2009). Komohara e colaboradores em 2008 demonstraram que pacientes com glioblastoma multiforme apresentam um maior infiltrado de macrófagos numa ativação tipo M2, (fenótipo anti-inflamatório/pró-tumoral) que pacientes com graus mais baixos de malignidade.

Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que a resposta imune desempenha função essencial na malignidade dos gliomas e que a sinalização purinérgica exerce a modulação dessa resposta (Braganhol et al, 2009; Braganhol et al, 2011). Diante dessas informações, nós resolvemos verificar a modulação do fenótipo dos macrófagos expostos ao meio condicionado de células de gliomas em cultura (GL-CM). Os resultados mostraram que os macrófagos apresentaram características típicas de uma diferenciação em um fenótipo análogo ao M2. Esse resultado foi determinado através da análise de parâmetros bioquímicos como: atividade da iNOS e arginase, perfil de expressão de RNAs mensageiros (FIZZ1 e Ym1) e pela secreção de citocinas. Nós verificamos que houve uma diminuição da produção de óxido nítrico, aumento de FIZZ1 e Ym1, aumento da produção de IL-10 e diminuição de TNF- α . Esses achados estão de acordo com outros dados da literatura (Biswas et al., 2006; Ghassabeh et al., 2006; Kuang et al., 2007;

Gabrusiewicz et al., 2011). Os TAM estão extremamente envolvidos com a produção de fatores angiogênicos como VEGF, PDGF, prostaglandina E2, bem como fatores que promovem um ambiente imunossupressor como CCL17, CCL22, IL-10 e TGF- β (Saijo e Glass, 2011). Como já mencionado, nós verificamos que houve uma diminuição de produção de TNF- α pelos macrófagos expostos ao meio condicionado de gliomas. Essa citocina pró-inflamatória é produzida principalmente por macrófagos em um fenótipo M1, ou seja, pró-inflamatório/antitumoral (MacMicking et al., 1997; Sunderkotter et al., 2004; Classen et al., 2009). Um recente estudo demonstrou que o uso de Paclitaxel (medicamento quimioterápico) induziu em macrófagos uma resposta semelhante à resposta desencadeada por macrófagos M1, onde ocorreu o aumento da produção de NO e TNF- α , ocasionando uma maior citotoxicidade para as células tumorais in vitro (Siveen e Kuttan, 2009). Isso vem a somar a uma série de trabalhos demonstrando como é importante que os macrófagos estejam ativados em um fenótipo pró-inflamatório (M1) para ajudar no combate as células malignas.

Uma vez determinado o fenótipo o qual os macrófagos foram modulados após a exposição do GL-CM, nós investigamos o envolvimento do sistema purinérgico nesse contexto. Sabe-se que a sinalização purinérgica é uma das vias que influenciam na iniciação, progressão e modulação da resposta imune, sendo que a resposta imune e câncer estão intimamente relacionados (Bours et al., 2011). O ATP, no espaço extracelular atua como uma molécula sinalizadora de dano e esse nucleotídeo está presente em concentrações suficientes no meio extracelular dos tecidos inflamados para ativar receptores do tipo P2 e promover o recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos e monócitos à área inflamada (Bours et al., 2011). Com relação à progressão tumoral, estudos demonstram que o ATP é capaz de induzir proliferação celular in vitro em linhagens de glioma e induzir morte no tecido cerebral normal (Morrone et al.; 2005). Em acordo com essa idéia, recentemente foi demonstrado in vivo que o acúmulo de ATP na periferia dos tumores, como em gliomas, pode modular uma série de sinalizações que controlam a resposta inflamatória e que estimulam a proliferação tumoral (Pellegatti et al.; 2008).

Além disso, a adenosina, produto da hidrólise do ATP, tem sido mostrada como uma importante molécula com ações anti-inflamatória e pró-tumoral (Spychala, 2000). Dessa forma, o fino balanço entre nucleotídeos e nucleosídeos e a consequente disponibilidade dessas moléculas para seus respectivos receptores é extremamente importante e regulado por ectoenzimas, incluindo a família das ENTPDases e a ecto-5`nucleotidase/CD73 (Bours et al., 2011). Nós constatamos que quando os macrófagos foram expostos aos meios condicionados de glioma, (GL-CM_{24h}, GL-CM_{48h} e GL-CM_{72h}), houve uma diminuição na atividade ATPásica, ADPásica e AMPásica, indicando que essas enzimas foram moduladas a favor de um acúmulo de ATP nesse microambiente.

Sabe-se, que o ATP pode atuar tanto como uma molécula pró-inflamatória como uma molécula anti-inflamatória (Bours et al., 2011). Pelegrin e Surprenant em 2009 demonstraram que o ATP em altas concentrações (maior que 5mM) foi capaz de produzir citocinas pró-inflamatórias em macrófagos num fenótipo M1, entretanto, essa mesma concentração em macrófagos num fenótipo M2, diminuiu a liberação de IL-1 β (citocina pró-inflamatória). Além disso, receptores do tipo P2, principalmente P2Y₁₁ e P2Y₁₂, ambos expressos em macrófagos, estão envolvidos com os efeitos anti-inflamatórios do ATP e também do ADP (Swennen et al., 2006). O ATP através da ligação ao receptor P2Y₁₁ mediou a inibição de TNF- α , citocina pró-inflamatória, enquanto que a ligação de ATP e ADP ao receptor P2Y₁₂ mediou a estimulação da produção de IL-10 (citocina anti-inflamatória) em células sanguíneas (Swennen et al., 2006). Nossos resultados demonstraram que há uma diminuição da hidrólise de ATP e ADP nos macrófagos expostos ao meio condicionado de gliomas. Um estudo demonstrou que a co-injeção de apirase juntamente com células de glioma C6, no cérebro de ratos, ocasionava um tumor de menor volume e com menor infiltrado inflamatório e angiogênese, ou seja, diminuía a malignidade do tumor (Morrone et al., 2006). Além disso, Braganhol e colaboradores demonstraram que o aumento da concentração de ADP ocasiona o aumento do volume e da malignidade do glioma implantado em ratos (Braganhol et al., 2009). Nesse mesmo estudo, foi também demonstrado que o ADP é hábil em recrutar macrófagos/microglia e plaquetas

para a área tumoral, muito provavelmente pela ativação de receptores do tipo $P2Y_{12}$, uma vez que o uso de clopidogrel (um antagonista específico de $P2Y_{12}$) reduziu fortemente o crescimento do tumor (Braganhol et al., 2009). Portanto, uma diminuição de hidrólise de ATP e ADP, resultado obtido nos nossos experimentos, auxiliam o recrutamento de macrófagos a área tumoral e é importante para a progressão do tumor.

Uma vez que verificamos a diminuição de hidrólise dos nucleotídeos em macrófagos expostos ao GL-CM, nós indagamos se essa diminuição estava relacionada com a diminuição do nível de proteína das enzimas ENTPDase 1, ENTPDase 2, ENTPDase 3 e ecto-5`nucleotidase/CD73 e/ou mRNA. Nós observamos que os macrófagos expostos ao meio condicionado tiveram uma diminuição do nível de proteína para as enzimas ENTPDase 2, ENTPdase 3 e ecto-5`-nucleotidase/CD73. Em relação aos níveis de expressão do mRNA, houve uma diminuição para o mRNA da ENTPDase 1e um aumento do mRNA para a ecto-5`nucleotidase/CD73, para as enzimas ENTPDase 2 e 3 o nível de mRNA permaneceu inalterado. Em relação aos resultados da atividade enzimática, expressão protéica e mRNA para as ENTPDases, nossos resultados, indicam que a enzima ENTPDase 2 e 3 são as principais enzimas envolvidas na hidrólise do ATP e do ADP por macrófagos diferenciados pela exposição ao meio condicionado de gliomas. Por outro lado, uma possível explicação para os resultados obtidos para a atividade AMPásica, expressão da proteína e mRNA da ecto-5`-NT/CD73 aparentemente controversos é que a baixa regulação da atividade enzimática e, ao mesmo tempo aumento dos níveis de mRNA é conhecido como feedback auto-regulador (Krishna et al., 2006 e Vuaden et al.; 2007). Portanto, o aumento na expressão do mRNA da ecto-5`-NT/CD73 e a diminuição na atividade e expressão da proteína pode ser explicado como um mecanismo compensatório das células, para tentar restaurar a atividade enzimática na superfície de células, a fim de produzir mais adenosina. Estes resultados devem ser investigados em experimentos futuros.

A IL-6 e a IL-10 são citocinas que são reguladas pelo fator NF-kB, servem como um fator de crescimento para vários tumores e estão envolvidas na diferenciação de macrófagos para um fenótipo M2 (Aggarwal e Gehlot, 2009). E essas três citocinas têm sido extremamente relacionadas com aumento da progressão tumoral. Isso nos levou a investigar também a produção de

citocinas por macrófagos expostos ao meio condicionado de glioma. Os resultados mostraram que houve um aumento das três citocinas citadas anteriormente. O MCP-1 é um fator quimioatraente para macrófagos/microglia e pode ser produzido tanto pelas células tumorais como pelos macrófagos infiltrados no tumor (TAM) (Platten et al., 2003; Rong et al., 2006; Jantaratnotai et al., 2009; Fang et al., 2011). As células de glioma produzem altas quantidades de MCP-1 e a maior expressão de MCP-1 por essas células tem sido relacionado com gliomas mais agressivos e com maior infiltração de microglia/macrófagos na área tumoral (Fang et al., 2011). Esse fator quimioatraente pode ser regulado através do ATP (Jantaratnotai et al., 2009). Nossos resultados demonstram que quando foi adicionado um antagonista de receptor purinérgico P2 (suramina), houve uma diminuição na produção de MCP-1. Esses achados estão de acordo com Jantaratnotai e colaboradores que mostraram que a adição de antagonista de receptor purinérgico diminui a produção de MCP-1 em células de glioma C6 de rato enquanto a adição de ATP leva ao aumento dessa quimiocina. Esse efeito é devido à inibição do receptor P2Y₂ (Jantaratnotai et al., 2009). Essas informações justificam os nossos resultados, uma vez que esse receptor está presente em macrófagos e é inibido por suramina (Jantaratnotai et al., 2009; Zanin et al., 2012). Um estudo recente em macrófagos alveolares mostrou que os nucleotídeos extracelulares como o ATP e ADP podem inibir a produção de IL-12 e TNF- α , enquanto a IL-6 é super-regulada (Myrtek et al., 2008). Esses dados também estão de acordo com os resultados encontrados nesse trabalho, uma vez que os macrófagos expostos ao meio condicionado de glioma tiveram um aumento da produção de IL-6 enquanto que a produção das duas citocinas pró-inflamatórias diminuiu.

Por fim, como demonstrado por outros estudos, os fenótipos M1 e M2 exercem um importante papel na progressão de tumores. Portanto, estudos que possam contribuir com o entendimento da modulação fenotípica dos macrófagos podem ajudar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no combate ao câncer, incluindo os gliomas (Siveen e Kuttan, 2009; Solinas et al., 2009). Os nucleotídeos, como ATP, as enzimas e os receptores do sistema purinérgico são de extrema importância para esse fino balanço dos fenótipos.

5. CONCLUSÕES

- ✓ Os macrófagos obtidos do peritônio de camundongo são modulados a um fenótipo do tipo M2 após a exposição ao meio condicionado de gliomas;
- ✓ Ocorre o aumento de importantes marcadores de um fenótipo M2 como YM1, FIZZ1 e IL-10. E ocorre a diminuição de marcadores de um fenótipo M1 como NO e TNF- α nos macrófagos expostos ao meio condicionado de gliomas;
- ✓ Houve a diminuição da hidrólise de ATP, ADP e AMP nos macrófagos expostos ao meio condicionado de gliomas;
- ✓ Houve um aumento na produção de citocinas envolvidas com recrutamento de monócitos e tumorigênese (IL-6, IL-10 e MCP-1) nos macrófagos expostos ao meio condicionado de gliomas;
- ✓ Houve uma reversão da produção das citocinas (IL-6 e MCP-1) quando adicionado suramina nos macrófagos expostos ao meio condicionado de gliomas;

Portanto, o fino balanço entre os fenótipos M1 e M2 seria um aspecto fundamental para o tratamento de algumas neoplasias, incluindo os gliomas (Siveen e Kuttan, 2009; Solinas et al., 2009). E os nucleotídeos, principalmente o ATP, as enzimas e os receptores do sistema purinérgico são de extrema importância para esse fino balanço dos fenótipos.

6. PERSPECTIVAS

1) Verificar o perfil dos receptores purinérgicos nos macrófagos após a exposição ao meio condicionado de gliomas;

2) Verificar a secreção de citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α) por macrófagos após a utilização de antagonistas específicos de receptores purinérgicos;

3) Verificar o efeito do meio condicionado de macrófagos estimulados a um fenótipo M1 (induzido por LPS) ou a um fenótipo M2 (induzido por IL-4) sobre células de glioma;

4) Verificar a ação dos fenótipos de macrófagos em um modelo in vivo de implante de gliomas e sua relação com as enzimas do sistema purinérgico.

7. REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M.; BURNSTOCK, G. Purinoceptores: are the families of the P2X and P2Y purinoceptores? Pharmacology and Therapeutics. v.64, n.3, p.445-475, 1994.

AGGARWAL, B.B., GEHLOT, P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? Current opinion in Pharmacol. v.9, p. 351-369, 2009.

AIRAS, L.; NIEMELA, J.; SALMI, M.; PUURUNEN, T.; SMITH, D.J.; JALKANEN, S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. J Cell Biology. v.136, n.2, p.421-431, 1997.

ALLAVENA, P.; SICA, A.; SOLINAS, G.; PORTA, C.; MANTOVANI, A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. Crit Ver Oncol Hematol. v.66, p.1-9, 2008.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet. v.357, p.539-545, 2001.

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. Nat Rv Cancer. v.4, p.540-550, 2004.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; CAPPELLARI, A.R.; ROCKENBACH, L.; FARIAS, P.F.; WINK, M.R.; DELGADO-CAÑEDO, A.; BATTASTINI, A.M. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. Mol Cell Biochem. v.319, p.61-68, 2008.

BISWAS, S.K.; GANGI, L.; PAUL, S.; SCHIOPPA, T.; SACCANI, A.; SIRONI, M.; BOTTAZZI, B.; DONI, A.; BRONTE, V.; PASQUALINI, F. A distinct and unique transcriptional programme expressed by tumor-associated macrophages: defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation. Blood. v. 107, p.2112-2122, 2006.

BOURS, M.J.; SWENNEN, E.L.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B.N., DAGNELIE, P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacol Ther. v.112, n.2, p.358-404, 2006.

BOURS, M.J.L.; DAGNELIE, P.C.; GIULIANI, A.L.; WESSELIUS, A.; DI VIRGILIO, F. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. Frontiers in Bioscience. v.S3, p.1443-1456, 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. v.172, p.218-254, 1976.

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.O. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. *v.100, n.8, p.1434–1442, 2009.*

BRAGANHOL, E.; ZANIN, R.F.; BERNARDI, A.; BERGAMIN, L.S.; CAPPELLARI, A.R.; CAMPESATO, L.F.; MORRONE, F.B.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.; EDELWEISS, M.I.; WINK, M.R.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S.C.; BATTASTINI, A.M. Overexpression of NTPDase2 in gliomas promotes systemic inflammation and pulmonary injury. *Purinergic Signal.* 2011.

BRIGATI, C.; NOONAN, D.M.; LIBBY, A.; BENELLI, R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis.* *v.19, p.247-258, 2002.*

BURNSTOCK, G. Introduction: P2 receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* *v.4, n.8, p.793-803, 2004.*

CHAN, K.; DELFERT, K. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Analytical Biochemistry.* *v.157, p.375-380, 1986.*

CLASSEN, A.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. Macrophage activation: classical vs. alternative. *Methods in Molecular Biology.* *v.531, 2009.*

CONDEELIS, J.; POLLARD, J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* *v.124, p.263-266, 2006.*

CORRALIZA, I.M.; CAMPO, M.L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods.* *v.174, p231–235, 1994.*

COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia Estrutural e funcional, sexta edição, editora Guanabara Koogan s.a, Rio de Janeiro, 2000.

COUSSENS L.M., WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature.* *v. 420, p.19–26, 2002.*

DAI, C.; HOLLAND, E.C. Glioma models. *Biochimica et Biophysica Acta: Reviews on Cancer.* *v.1551, n.1, p.M19-M27, 2001.*

DAVID, S.; KRONER, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature.* *v.12, p.388-399, 2011.*

DEAGLIO, S.; DWYER, K.M.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; USHEVA, A.; ERAT, A.; CHEN, J.F.; ENJYOJI, K.; LINDEN, J.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K.; STROM, T.B.; ROBSON, S.C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* *v.204, n.6, p.1257-1265, 2007.*

DEMUTH, T.; BERENS, M. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol.* *v.70, p.217-228, 2004.*

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J.M. **Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells.** *Blood.* v.97, p.587-600, 2001.

EDWARDS, J.P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K.A.; MOSSER, D.M. **Biochemical and functional characterization of three activated macrophages populations.** *J Leuk Biol.* v.80, p.1298-1307, 2006.

FANG, K.M.; WANG, Y.L.; HUANG, M.C.; SUN, S.H.; CHENG, H.; TZENG, S.F. **Expression of macrophage inflammatory protein-1- α and monocyte chemoattractant protein-1 in glioma-infiltrating microglia: involvement of ATP and P2X₇ receptor.** *J Neuro Research.* v.89, p.199-211, 2011.

FISHER, J.L.; SCHWARTZBAUM, J.A.; WRENSCH, M.; WIEMELS, J.L. **Epidemiology of brain tumors.** *Neurologic Clinics.* v.25, n.4, p.867-890, 2007.

FRANTZ, S.; VINCENT, K.A.; FERON, O.; KELLY, R.A. **Innate immunity and angiogenesis.** *Circ Res.* v. 96, p.15–56, 2005.

GABRUSIEWICZ, K.; ELLERT-MIKLASZEWSKA, A.; LIPKO, M.; SIELSKA, M.; FRANKOWSKA, M.; KAMINSKA, B. **Characteristics of the Alternative Phenotype of Microglia/Macrophages and its Modulation in Experimental Gliomas.** *Plos One.* v.6, n.8, p.e23902-23914, 2011.

GHASSABEH, G.H.; DE BAETSELIER, P.; BRYNS, L.; NOEL, W.; VAN GINDERACHTER, J.A.; MEERSCHAUT, S.; BESCHIN, A.; BROMBACHER, F.; RAES, G. **Identification of a common gene signature for type II cytokine-associated myeloid cells elicited in vivo in different pathologic conditions.** *Blood.* v.108, p.575-583, 2006.

GORDON, S. **Alternative activation of macrophages.** *Nat Reviews Immunol.* v.3, n.1, p.23-35, 2003.

GORDON, S. **The macrophage: past, present and future.** *Eur J Immunol.* v.37, p.S9-S17, 2007.

GRATCHEV, A.; KZHYSHKOWSKA, J.; UTIKAL, J.; GOERDT, S. **Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages.** *J Immunol.* v.61, p.10–17, 2005.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. **Purification and cloning of a soluble ATPdiphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*).** *Biochem Biophys Res Commun.* v.218, n.3, p.916-923, 1996.

HESS, K.R.; BROGLIO, K.R.; BONDY, M.L. **Adult Glioma Incidence Trends in the United States, 1977-2000.** *Cancer.* v.101, n.10, p.2293-2299, 2004.

HONG, T.M.; TENG, L.J.; SHUN, C.T.; PENG, M.C.; TSAI, J.C. Induced interleukin-8 expression in gliomas by tumor-associated macrophages. J Neurooncol. v. 93, n.3, p.289-291, 2009.

HU, D.E.; HORY, Y.; FAN, T.P. Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. Inflammation. v.17, p.135-143, 1993.

ILLES, P.; KLOTZ, N.; LOHSE, M. Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. Naurnyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. v.362, p.295-298, 2000.

JANTARATNOTAI, K.; CHOI, H.B.; McLARNON, G. ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells. BMC Cancer. v.9, p.442-452, 2009.

KOBIE, J.J.; SHAH, P.R.; YANG, L.; REBHAWN, J.A.; FOWELL, D.J.; MOSMANN, T.R. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. J Immunol. v.177, n.10, p.6780-6786, 2006.

KOMOHARA, Y.; OHNISHI, K.; KURATSU, J.; TAKEYA, M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. J Pathol. v.216, n.1, p.15-24, 2008.

KONOPKA, G.; BONNI, A. Signaling pathways regulation, gliomagenesis. Current molecular medicine. v.3, p.73-84, 2003.

KRISHNA, S.; ANDERSSON, A.M.; SEMSEY, S.; SNEPPEN, K. Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. Nucleic Acids Research. v.34, n.8, p.2455-2462, 2006.

KUANG, D.; WU, Y.; CHEN, N.; CHENG, J.; ZHUANG, S.; ZHENG, L. Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. Blood. v. 110, p.587-595, 2007.

LACROIX, M.; ABI-SAID, D.; FOURNEY, D.R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. J Neurosurgery. v.95, p.190-198, 2001.

LAVOIE, E.G.; KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S.A. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. Biochem Pharmacol. v.67, p.1917-1926, 2004.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. Nature. v.420, p.868-874, 2002.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods v.25, p.402-408, 2001.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. **Nitric oxide and macrophage function.** *Annu Rev Immunol.* v.15, p.323-50, 1997.

MAHER, E.A.; FURNARI, F.B.; BACHOO, R.M.; ROWITCH, D.H.; LOUS, D.N.; CAVENEE, W.K.; DEPINHO, R.A. **Malignant glioma, genetics and biology of a grave matter.** *Genes and Development.* v.15, p.1311-1333, 2001.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.** *Trends Immunol.* v.25, p.677-686, 2004a.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A. **Tumor-associated macrophages as a prototypic type II polarized phagocyte population: role in tumor progression.** *Eur J Cancer.* v.40, p.1660-1667, 2004b.

MANTOVANI, A.; SICA, A. **Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity.** *Current Opinion in Immunology.* v.2, p.231-237, 2010.

MANTOVANI, A.; GERMANO, G.; MARCHESI, F.; LOCATELLI, M.; BISWAS, S.K. **Cancer-promoting tumor-associated macrophages: New vistas and open questions.** *Eur J Immunol.* v.41, p.2470-2525, 2011.

MARTINEZ, F.O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. **Macrophage activation and polarization.** *Front Biosci.* v.13, p.453-461, 2008.

MEDZHITOV, R. **Origin and physiological roles of inflammation.** *Nature.* v.24, p.428-35, 2008.

MORA, R.; ABSCHUETZ, A.; KEES, T.; DOKIC, I.; JOSCHKO, N.; KLEBER, S.; GEIBIG, R.; MOSCONI, E.; ZENTGRAF, H.; MARTIN-VILLALBA, A.; RÉGNIER-VIGOUROUX, A. **TNF- α and TRAIL-resistant glioma cells undergo autophagy-dependent cell death induced by activated microglia.** *Glia.* v.57, p.561-581, 2009.

MORRONE, F.B.; HORN, A.P.; STELLA, J.; SPILLER, F.; SARKIS, J.J.; SALBEGO, C.G.; LENZ, G.; BATTASTINI, A.M. **Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity.** *J Neurooncol.* v.71, n.2, p.135-1340, 2005.

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. **In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model.** *BMC Cancer.* v.23, n.6, p.226, 2006.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. **Exploring the full spectrum of macrophages activation.** *Nature Reviews Immunol.* v.8, p.958-969, 2008.

MURRAY, J.; WYNN, T.A. **Protective and pathogenic functions of macrophage subsets.** *Nature.* v.11, p.723-737, 2011.

MYRTEK, D.; MÜLLER, T.; GEYER, V.; DERR, N.; FERRARI, D.; ZISSEL, G.; DÜRK, T.; SORICHTER, S.; LUTTMANN, W.; KUEPPER, M.; NORGAEUER, J.; DI VIRGILIO, F.; VIRCHOW, C.; IDZKO, M. **Activation of Human Alveolar Macrophages via P2 Receptors: Coupling to Intracellular Ca²⁺ Increases and Cytokine Secretion.** *J Immunol.* v.181, p.2181-2188, 2008.

NELMS, K.; KEEGAN, A.D.; ZAMORANO, J.; RYAN, J.J.; PAUL, W.E. **The IL-4 receptor: signalling mechanisms and biologic functions.** *Annu Rev Immunol.* v.17, p.701-738, 1999.

OHTA, A.; GORELIK, E.; PRASAD, S.J.; RONCHESE, F.; LUKASHEV, D.; WONG, M.K.; HUANG, X.; CALDWELL, S.; LIU, K.; SMITH, P.; CHEN, J.F.; JACKSON, E.K.; APASOV, S.; ABRAMS, S.; SITKOVSKY, M. **A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells.** *Proc. USA.* v.103, p.13132-13137, 2006.

PALMER, T. M.; STILES G.L. **Adenosine receptors.** *Neuropharmacology.* v.34, n.7, p.683-694, 1995.

PELEGRIN, P.; SURPRENANT, A. **Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1-beta release through pyrophosphates.** *EMBO J.* v.28, n.14, p. 2114-2127, 2009.

PELLEGATTI, P.; RAFFAGHELLO, L.; BIANCHI, G.; PICCARDI, F.; PISTOIA, V.; DI VIRGILIO, F. **Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase.** *Plos One.* v.3, n.7, p.2599-e2537, 2008.

PEPPER, M.S. **Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v.21, p.1104-1117, 2001.

PLATTEN, M.; KRETZ, A.; NAUMANN, U.; AULWURM, S.; EGASHIRA, K.; ISENMANN, S.; WELLER, M. **Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas.** *Ann Neurol.* v. 54, n.3, p.388-392, 2003.

POLLARD, J.W. **Tumor-educated macrophages promote tumors progression and metastasis.** *Nature.* v.4, p.71-78, 2004.

RAES, G.; NOËL, W.; BESCHIN, A.; BRYS, L.; DE BAETSELIER, P.; HASSANZADEH, G.H. **FIZZ1 and Ym1 as tools to discriminate between differentially activated macrophages.** *Develop Immunol.* v.9, n.3, p.151-159, 2002.

ROBSON, S.C.; WU, Y.; SUN, X.; KNOSALLA, C.; DWYER, K.; ENJOYOJI, K. **Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation.** *Semin Thromb Hemost.* v.31, n.2, p.217-233, 2005.

ROBSON, S.C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signal. v.2, p.409-430, 2006.

RONG, Y.; DURDEN, D.L.; VAN MEIR, E.G.; BRAT, D.J. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. J Neuropathol Exp Neurol. v.65, n.6, p.529-539, 2006.

ROUSSEAU, A.; MOKHTARI, K.; DUYCKAERTS, C. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system- what has changed? Current Opinion in Neurology. v.21, n.6, p.720-727, 2008.

SABIROV, R.Z.; OKADA, Y. ATP release via anion channels. Purinergic Signal. v.1, n.4, p.311-328, 2005.

SAIJO, K.; GLASS, C.K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. Nature. v.11, p.775-787, 2011.

SAMPEDRO, M. N.; ARGOS, B. V.; NICOLA, D. G.; MAYORALAS, A.F.; DÍAZ M. N. Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune system. Clinical Medicine Insights: Oncology. v. 5, p.265-314, 2011.

SATHORNSUMETEE, S.; REARDON, D.A.; DESJARDINS, A.; QUINN, J.A.; VREDENBURGH, J.J.; RICH, J.N. Molecularly Targeted Therapy for Malignant Glioma. Cancer. v.110, n.1, p.13-24, 2007.

SICA, A.; BRONTE, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. J Clin Invest. v.117, p.1155-1166, 2007.

SITKOVSKY, M.V.; OHTA, A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? Trends Immunol. v.26, n.6, p.299-304, 2005.

SIVEEN, K.S.; KUTTAN, G. Role of macrophages in tumor progression. Immunology Letters. v.123, p.97-102, 2009.

SOLINAS, G.; GERMANO, G.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Tumor-associated macrophage (TAM) as major players of the cancer related inflammation. J Leukoc Biol. v. 86, p.1065-1073, 2009.

SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. Pharmacol Ther. v.87, p.161-173, 2000.

STAGG, A.; SMYTH, M.J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. Oncogene. v.29, p.5346-5358, 2010.

STUEHR, D.J.; NATHAN, C.F. Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. The Journal of Experimental Medicine. v.169, p.1543-1555, 1989.

SUNDERKÖTTER, C.; NIKOLIC, T.; DILLON, M.J.; VAN ROOIJEN, N.; STEHLING, M.; DREVETS, D.A.; LEENEN, P.J. **Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response.** *J Immunol.* v.172, n.7, p.4410-4417, 2004.

SWENNEN, E.L.R.; BAST, A.; DAGNELIE, P.C. **Purinergic receptors involved in the immunomodulatory effects of ATP in human blood.** *Biochem Biophys Res Commun.* v.29, n.3, p.1194-1199, 2006.

VARIN, A.; GORDON, S. **Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology.** *Immunobiology.* v.214, n.7, p.630-641, 2009.

VERKHRASKY, A.; KRISHTAI, O.; BURNSTOCK, G. **Purinoreceptors on Neuroglia.** *Molecular Neurobiology.* v. 39, n.3, p.190-208, 2009.

VORHOFF, T.; ZIMMERMANN, H.; PELLETIER, J.; SÉVIGNY, J.; BRAUN, N. **Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin.** *Purinergic Signal.* v.1, p.259-270, 2005.

VUADEN, F.C.; COGNATO, G.P.; BONORINO, C.; BOGO, M.R.; SARKIS, J.J.F., BONAN, C. **Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats.** *Life Sciences.* v.80, p.1784–1791, 2007.

WATANABE, K.; TACHIBANA, O.; SATA, K.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. **Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas.** *Brain Pathology.* v.6, n.3, p.217-223, 1996.

WATTERS, J.J.; SCHATNER, J.M.; BADIE, B. **Microglia function in brain tumors.** *J Neurosci Res.* v.81, p.447–455, 2005.

WEN, P. Y.; KESARII, S. **Malignant Gliomas in Adults.** *The New England Journal of Medicine.* v. 359, n.5, p.492-507, 2008.

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. **P2 receptors and cancer.** *Trends in Pharmacological Sciences.* v.27, n.4, p.211-217, 2006.

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

YEGUTKIN, G. G. **Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade.** *Biochimica et Biophysica Acta.* v.1783, p.673-694, 2008.

ZANIN, R.F.; BRAGANHOL, E.; BERGAMIN, L.S.; CAMPESATO, L.F.I.; FILHO, A.Z.; MOREIRA, J.C.F.; MORRONE, F.B., SÉVIGNY, J.; SCHETINGER, M.R.C.; WYSE, A.T.S.; BATTASTINI, A.M.O. **Differential**

macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. Plos One. 2012.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. Biochem J. v.285(Pt 2), p.345-365, 1992.

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

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. Drug Dev Res. v.52, p.44-56, 2001.

www.crri.ca/sevigny.html. Acesso em 20 de dezembro de 2011

8. ANEXOS

8.1 Produção científica durante o período do mestrado

➤ Artigos Publicados

BRAGANHOL, E.; ZANIN, R.F.; BERNARDI, A.; BERGAMIN, L.S.; CAPPELLARI, A.R.; CAMPESATO, L.F.; MORRONE, F.B.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.; EDELWEISS, M.I.; WINK, M.R.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S.C.; BATTASTINI, A.M. **Overexpression of NTPDase2 in gliomas promotes systemic inflammation and pulmonary injury. Purinergic Signal. 2011.**

ZANIN, R.F.; BRAGANHOL, E.; BERGAMIN, L.S.; CAMPESATO, L.F.I.; FILHO, A.Z.; MOREIRA, J.C.F.; MORRONE, F.B., SÉVIGNY, J.; SCHETINGER, M.R.C.; WYSE, A.T.S.; BATTASTINI, A.M.O. **Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. Plos One. 2012.**

8.2 Normas para submissão de artigos para a Revista Purinergic Signalling

Instruções para os autores:

Título deve conter:

- Nome dos autores
- Título informativo
- Afiliação e endereço dos autores
- E-mail, endereço e telefone do autor correspondente.

Formato do texto:

- Manuscrito deve ser submetido em Word;
- Usar uma fonte normal para o texto (ex.: Times Roman, 10);
- Usar itálico para ênfase;
- Salvar o arquivo em formato docx (Word 2007 ou mais) ou doc (versões mais antigas do Word).

Acknowledgments:

- Agradecimento para pessoas, fundos, subsídios devem ser colocados antes da lista de referência. O nome dos órgãos de financiamento deve ser colocado por inteiro.

Citações:

- As referências bibliográficas devem ser colocadas através de números dentro de colchetes ao longo do texto ([1]; [1-4, 7]);
- As referências só devem ser colocadas se citadas no texto e os trabalhos devem estar publicados ou aceitos para a publicação;
- Segue exemplo de modelo de referência:
[11] Burnstock G (2004) Introduction: P2 receptors. *Cur Top Med Chem* 4(8):793-803

Tabelas:

- Devem ser numeradas com números arábicos.

Figuras:

- *Devem ser numeradas com números arábicos;*
- *As figuras devem ser citadas no texto em ordem da numeração;*
- *Figuras subdivididas devem ser denotadas com (a,b,c e etc).*