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

Fabiana de Mattos Manica

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 NA PROGRESSÃO DE GLIOMAS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA PADRÃO

Porto Alegre
2021

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

Fabiana de Mattos Manica

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 NA PROGRESSÃO DE GLIOMAS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA PADRÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica. Orientador (a): Prof. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini

Porto Alegre
2021

Dedico este trabalho, à minha sobrinha,
Beatriz, que trouxe luz para nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a oportunidade de trabalhar com a professora Ana Battastini, uma profissional exemplar, que é uma grande fonte de inspiração pra mim, uma mulher que se consolidou uma grande cientista quando a ciência só tinha espaço para homens. Gostaria de agradecer por todas às oportunidades que recebi e por ter me acolhido em seu laboratório quando eu ainda era uma menina. Muito obrigada por todo o tempo dedicado ao meu aprendizado, por todo o afeto e por sempre me incentivar.

Agradeço ao meu Co-orientador, Fabrício Figueiró e aos meus colegas de laboratório, por todo o aprendizado e parceria ao longo dos últimos anos. Obrigada por tornarem o caminho mais leve.

Agradeço aos meus pais, por me incentivarem aos estudos e por me proporcionarem uma vida digna, na qual pude me tornar a profissional que sou hoje. Sem todo esse apoio eu não estaria aqui, muito obrigada por fazerem dos meus, os seus sonhos. Agradeço também às minhas irmãs, Raquel e Luiza por todo o apoio, especialmente quando tudo ficou mais difícil em 2020 e a minha vó Adiles, que está sempre ao nosso lado e nunca mediu esforços para nos ajudar.

Minha enorme gratidão ao meu companheiro Gustavo. Muito obrigada pelo companheirismo, por não medir esforços em me ajudar, pela paciência, pelo carinho, por me apoiar nos meus objetivos e pelo crescimento pessoal.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Bioquímica e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica e aos componentes da banca pela disponibilidade na avaliação desse trabalho.

Por fim, agradeço ao Ministério da Educação e às agências de fomento CNPq, CAPES, INCT, FAPERGS e PROPESQ/UFRGS, por financiarem os meus estudos e proporcionar o desenvolvimento da ciência no país.

SUMÁRIO

PARTE I 6

RESUMO 7

LISTA DE ABREVIATURAS 9

1. INTRODUÇÃO 11

1.1 Tumores do sistema nervoso central 11

1.2 Glioma 12

1.3 Glioblastoma 14

1.4 Tratamentos Padrão 16

1.5 Tratamentos não padrão e inovadores 19

1.6 Sistema Purinérgico 22

1.7 Ecto-5'-nucleotidase e o Câncer 26

1.8 Ecto-5'-nucleotidase e sua função protéica 27

1.9 Ecto-5'-nucleotidase e sua função enzimática na resistência a drogas 30

1.10 Cultivo celular utilizando células C6 de glioma de rato 32

2. OBJETIVO 34

PARTE II 36

3. RESULTADOS 37

CAPÍTULO I 37

CAPÍTULO II 68

PARTE III 87

4. DISCUSSÃO GERAL 88

5. CONCLUSÃO 95

6. PERSPECTIVAS 96

7. REFERÊNCIAS 97

8. ANEXOS 111

PARTE I

RESUMO

Os gliomas são o tipo tumoral que mais acomete o SNC. O glioblastoma (GBM) é um glioma de grau IV, originado de astrócitos ou de células precursoras de astrócitos. O GBM é um tumor bastante agressivo, que apresenta uma elevada taxa de proliferação e um comportamento altamente invasivo. Muitos estudos têm demonstrado que o GBM apresenta um aumento da atividade e expressão da ecto-5'-nucleotidase/CD73 (e5NT/CD73), comportamento oposto às células análogas normais, os astrócitos, e que essa enzima auxilia na progressão desses tumores. Além da função enzimática, foi mostrado que a e5NT/CD73 também exerce importante papel na interação célula-célula e célula-matriz. As células C6 de glioma de rato são descritas como um ótimo modelo *in vitro* para estudo de gliomas e em altas passagens são utilizadas como modelo de astrócito. Estudos do nosso laboratório demonstraram que cérebro de ratos inoculados com células C6 de alta passagem, desenvolvem tumores menores, em relação aos animais em que foram implantadas células C6 de baixa passagem. Com isso, no presente estudo caracterizamos o papel desempenhado pela e5NT/CD73 no crescimento de GBM *in vitro* e *in vivo*. Foi observado uma significativa redução da hidrólise do AMP pelas células C6 de baixa passagem. Esse resultado foi confirmado por citometria de fluxo, onde demonstrou-se que essa célula expressa menos e5NT/CD73 e que o perfil de expressão das NTPDases é bastante semelhante nas duas linhagens. Em relação a capacidade proliferativa das células, verificamos por marcação para Ki67, que as linhagens não diferem em relação à proliferação. Entretanto quando tratadas com AMP (substrato da e5NT/CD73), apenas as células C6 de baixa passagem modificam o perfil de crescimento. Assim, demonstrando a importância da presença de e5NT/CD73 e consequente formação de adenosina para a progressão dos gliomas. Verificamos também alguns parâmetros de malignidade que envolvem a e5NT/CD73, já que é também uma proteína que auxilia na adesão e migração. Observamos que as células C6 de baixa passagem possuem uma capacidade adesiva menor e consequentemente, uma capacidade maior de migração comparada a C6 de alta passagem. Além disso, verificamos que quando tratamos com APCP (inibidor da e5NT/CD73), as células C6 de baixa passagem tem seu potencial de migração reduzido, demonstrando que a migração é dependente, pelo menos em parte, da atividade da e5NT/CD73. Esses resultados foram confirmados pela análise de formação de colônia, onde verificamos que as células C6 de baixa passagem formam mais e maiores colônias que as células C6 de alta passagem, mesmo apresentando uma capacidade proliferativa muito semelhante, além disso, o APCP foi capaz de reduzir a formação de colônias. Adicionalmente, como já observado anteriormente, células C6 de alta passagem desenvolvem tumores menores quando implantadas no estriado de ratos. Em contrapartida as células C6 de baixa passagem desenvolvem tumores característicos de GBM. Esses dados em conjunto demonstram que a presença da e5NT/CD73 é fundamental para a progressão do GBM e que a mesma representa um alvo interessante na corrida por tratamentos mais eficazes contra esse tumor. Finalmente, na segunda parte da presente Dissertação não foi possível chegar a uma conclusão clara entre o envolvimento da e5NT/CD73 e a resistência celular à temozolamida. Outros estudos são necessários para avaliarmos uma possível relação.

ABSTRACT

Gliomas are the tumor that most affects the CNS. Glioblastoma (GBM) is a grade IV glioma, originating from astrocytes or astrocyte precursor cells. GBM is a very aggressive tumor, with a high proliferation rate and highly invasive behavior. Many studies have shown that GBM shows an increase in the activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 (e5NT/CD73), opposite to normal analog cells, astrocytes, and that this enzyme helps in the progression of these tumors. In addition to the enzymatic function, it has been shown that e5NT/CD73 also plays an important role in cell-cell and cell-matrix interaction. C6 rat glioma cells are described as an excellent *in vitro* model for studying gliomas and in late passages are used as an astrocyte model. Studies in our laboratory have shown that the brains of mice inoculated with late-pass C6 cells develop smaller tumors than animals in which early-pass C6 cells were implanted. Thus, in the present study we characterize the role played by e5NT/CD73 in the GBM grow in vitro and in vivo. A significant reduction in late-pass C6 AMP hydrolysis was observed, this result was confirmed by flow cytometry, where it was demonstrated that this cell expresses less e5NT/CD73 and that the expression profile of NTPDases are similar in both C6 line. Regarding the proliferative capacity of cells, we verified by Ki67, that the cells do not differ in relation to proliferation, however when treated with AMP (e5NT/CD73 substrate), only the early-pass C6 cells modify the growth profile, demonstrating the importance of the presence of e5NT/CD73 and the consequent formation of adenosine for the glioma progression. We also verified some malignancy parameters that involve e5NT/CD73, since it is also a protein that assists in adhesion and migration, and we observed that early-pass C6 cells have a lower adhesive capacity and, consequently, a higher migration capacity compared to late-pass C6. In addition, we found that the addition of APCP (e5NT/CD73 inhibitor) in early-pass C6 cells has reduced migration potential, demonstrating that migration is dependent, at least in part, on the activity of e5NT/CD73. These results were confirmed in vitro, by the analysis of colony formation, where we verified that the early-pass C6 cells form more and larger colonies than the late-pass C6 cells, even with a very similar proliferative capacity, in addition, the APCP was able to reduce the formation of colonies. Furthermore, as it was previously observed, late-pass C6 developed small tumor mass in the striatum of rats, which was confirmed by immunohistochemistry analyses. In contrast, all rats injected with early-pass C6 cells developed tumors with all histopathological features of GBMs. Taken together these results demonstrate that the presence of e5NT/CD73 is fundamental for the progression of GBM and that it represents an interesting target for more effective treatments against GBM. Finally, it was not possible to reach a clear conclusion between the involvement of e5NT/CD73 and cell resistance to temozolamide. Further studies are needed to assess a possible relationship.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA - ecto-adenosina desaminase

ADP - adenosina difosfato

AKT – Proteína quinase B

AMP - adenosina monofosfato

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

APCP - 5'-α,β-metileno-ADP

ATP - adenosina trifosfato

CTLA4 - Proteína-4 Associada a Linfócitos T Citotóxicos

e5NT/CD73 – ecto-5'-nucleotidase/CD73

EGFR - receptor do fator de crescimento epidermal

E-NPPs - ecto- nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

E-NTPDase - ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

FDA - Food and Drug Administration

GBM – Glioblastoma

GPI – glicosilfosfatidilinositol

IDH - Isocitrato desidrogenase

MAPK - proteína cinase ativada por mitógenos

MEC – matriz extracelular

MGMT - O6-metilguanina-DNA metil-transferase

MRP1 - proteína associada à resistência a multidrogas 1

MTIC - 5-[3-metiltriazeno-1-il]imidazol-4-carboxamida

MTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

OMS – organização mundial da saúde

P1 - receptor purinérgico metabotrópico para adenosina

P2X - receptor purinérgico ionotrópico

P2Y - receptor purinérgico metabotrópico

p53 - gene supressor tumoral *(tumor protein p53)*

PD-1 - Proteína de Morte Celular Programada 1

PDL-1 Ligante de Morte Programada 1

PDGFRA - Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PTEN - homólogo fosfatase e tensina deletado do cromossomo 10

SNC – sistema nervoso central

SUS – Sistema único de saúde

TEP1 – Componente 1 da telomerase

TMZ – Temozolamida

TTF - *Tumour-treating fields*

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumores do sistema nervoso central

O sistema nervo central (SNC) é composto pelo cérebro e a medula espinhal, dentre todos os tumores malignos no mundo, cerca de 1,5% correspondem ao câncer do SNC, sendo que 88% desses tumores estão localizados no cérebro (Ostron *et al*., 2015). Em 2018, estudos feitos pela Internacional Agency for Research on Cancer, projeto Globocan, demonstraram uma incidência de aproximadamente 296 mil novos casos com 241 mil mortes para o ano de estudo, sendo estimados mais de 11 milhões de novos casos até o ano de 2040 (GLOBOCAN 2018).

A forma de classificação dos tumores do SNC é estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que nas últimas décadas classificava esses tumores conforme a região em que se localizavam e as características histológicas do tumor, segregando de acordo com a localização, célula de origem e os níveis de diferenciação e infiltração (Louis *et al*., 2007). Pesquisas realizadas nas últimas décadas esclareceram melhor a base genética da tumorigênese, possibilitando o entendimento acerca da relação genética e morfologia tumoral, o que possibilitou uma melhor classificação desses tumores, assim sendo, a OMS lançou em 2016 uma nova classificação para os tumores do SNC, onde leva em consideração também fatores moleculares. Desta forma, os tumores do SNC foram agrupados nas seguintes categorias: tumores difusos astrocíticos e oligodendrogliais, outros tumores astrocíticos, tumores ependimais, outros gliomas, tumores neuronais e neuro-gliais, tumores pineais, tumores de células germinativas, tumores embrionais,

tumores dos nervos cranianos e paraespinais, meningiomas, tumores mesenquimais, tumores melanocíticos, linfomas, tumores da região selar e tumores metastáticos (Louis *et al*., 2016).

1.2 Glioma

Glioma é um termo geral que se refere a todos os tumores originados de células da glia, abrangendo um grupo muito diversificado de tumores. Os gliomas são os tumores primários que mais acometem o SNC e abrangem dois subtipos: gliomas difusos e gliomas que apresentam um padrão de crescimento mais circunscrito (não difuso) (Brandner e Jaunmuktane 2017). A categoria dos tumores difusos astrocíticos e oligodendrogliais é composta pelos tumores originados de astrócitos e oligodendrócitos, na qual estão compreendidos alguns tipos de glioma, como:

- Astrocitoma difuso (grau II)
- Astrocitoma anaplástico (grau III)
- Oligodendroglioma (grau II)
- Oligodendroglioma anaplástico (grau III)
- Glioma de linha média (grau IV)
- Oligoastrocitoma (grau II ou III)
- Glioblastoma (grau IV)

As novidades dessa classificação trazem a inclusão do glioma difuso de linha média, um glioma de grau IV, que acomete mais crianças e adolescentes e a exclusão do astrocitoma pilocítico, antigo glioma de grau I, que foi recolocado na categoria de "outros gliomas astrocíticos". Importante destacar que essa nova classificação compreende apenas gliomas de grau II, III e IV (Louis *et al*., 2016). Outra novidade na atual classificação da OMS é a avaliação de alterações moleculares desses tumores de forma complementar a histologia, com a finalidade de auxiliar as abordagens terapêuticas. A avaliação da mutação no gene da

Isocitrato desidrogenase (IDH) foi adicionado para subdividir os gliomas difusos, classificando-os em IDH-mutante e IDH-selvagem. Com essa subdivisão, os gliomas do tipo IDH-selvagem, mesmo com uma classificação histológica de grau II e III se encaixariam num quadro clínico de pior prognostico, uma vez que, foi demonstrado que tumores com essa assinatura molecular muitas vezes se comportam como glioblastoma (grau IV). Para os oligodendrogliomas, além da IDH, também se aconselha a avaliação da codeleção 1p/19q (Wesseling e Capper 2018). Dentre todos os gliomas difusos citados, o mais comum é o glioblastoma (GBM), grau IV, que apresenta características de malignidade avançadas, como hipercelularidade, áreas necróticas, edema e proliferação vascular, sendo muitas vezes refratário a quimioterapia e radioterapia (RT). O GBM, está subdividido em 3 subtipos: GBM, Isocitrato desidrogenase (IDH)-selvagem; GBM, IDH-mutante; e GBM não especificado (IDH não avaliado) (Wesseling e Capper 2018).

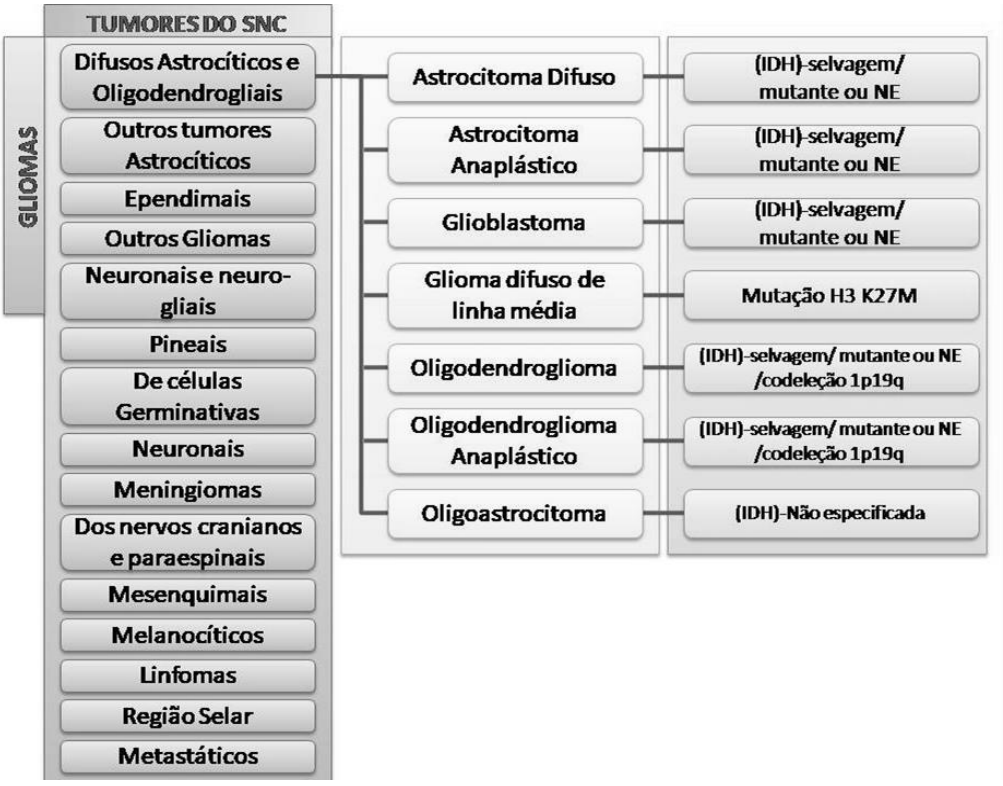


Figura 1: Classificação dos tumores do SNC e subdivisões dos gliomas difusos astrocíticos e oligodendrogliais, com suas respectivas classificações, segundo a classificação da OMS de 2016. Esquema de autoria própria.

1.3 Glioblastoma

O GBM é mais comum dentre os tumores gliais, com uma incidência média de 7:100.000 casos por ano é também o mais maligno, com uma sobrevida global de apenas 15 meses e com menos de 5% dos pacientes sobrevivendo mais de 5 anos após o diagnóstico. Esse tipo tumoral pode se manifestar em qualquer idade, mas sua maior incidência encontra-se entre 45 a 85 anos (Ostron *et al*., 2015). Suas principais características histológicas são a presença de hipercelularidade com células gliais imaturas, pequenas e arredondadas, com núcleos hipercromáticos polimórficos, citoplasma de limite impreciso e diminuição da relação núcleo/citoplasma (Laws e Shaffrey, 1999). Possuem um crescimento rápido e agressivo, com extensiva invasão do parênquima, causando necrose de diversas áreas do tecido nervoso com formação de edema. Na área do tumor é possível observar uma grande quantidade de vasos sanguíneos hipertrofiados no interior e nas áreas adjacentes, assim como, a presença de células do sistema imune, como os macrófagos e linfócito (Li *et al*., 2019 e Solinas *et al*., 2009).

O GBM foi reclassificado pela OMS no ano de 2016 em (IDH)-selvagem, o qual corresponde a cerca de 90% dos casos, frequentemente relacionado ao GBM primário como era definido anteriormente, com predominância em pacientes acima de 55 anos e pior prognóstico. O GBM (IDH)-mutado, representa 10% dos casos, estando intimamente relacionado ao GBM secundário, acometendo pacientes mais jovens com idade média de 44 anos e com melhor prognóstico. Sendo então, o *status* de mutação da IDH um apoio para a classificação de glioma primário ou secundário. Quando o *status* da IDH do tumor não pode ser realizada, denomina-se GBM não especificado (Yan *et al*., 2009 e Louis *et al*., 2016).

Estudos demonstraram que mutações no gene da IDH poderiam conectar mutações genéticas, reprogramação metabólica e modulação epigenética com a progressão tumoral. Foi observado que mutações no códon 132 ou 172 da IDH, resultam em uma nova atividade enzimática produzindo 2-hidroxiglutarato, que por sua vez irá inibir a atividade de desmetilase do domínio Jumonji e hidroxilase da família TET. Essa alteração confere um fenótipo metilado ao DNA das células tumorais nas ilhas CpG (G-CIMP high), resultando em um estado inativo de genes ligados à diferenciação celular, com isso, diminuindo a progressão tumoral com uma melhor sobrevida global (Xu *et al.*, 2011 e Ceccarelli *et al.*, 2016). Além disso, tem sido demonstrado que uma mudança no padrão de metilação, resultando em sua diminuição, (G-CIMP high para G-CIMP low), mesmo com IDH-mutado, confere uma progressão maligna e com menor sobrevida (Ceccarelli *et al.*, 2016).

Gliomas do tipo IDH-selvagem não demonstram uma assinatura molecular muito clara, inúmeras alterações genéticas e epigenéticas são encontradas nessa subdivisão. As principais alterações moleculares encontradas são a amplificação do receptor do fator de crescimento ependimal (EGFR) e a variante III do gene de EGFR (EGFRvIII), deleção completa do alelo q10, região que codifica genes supressores de tumor como PTEN / MMAC1 / TEP1 e amplificação dos genes do Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas tipo Alfa (PDGFRA) (Verhaak *et al*., 2010 e Wood *et al*., 2019). Acredita-se que o aumento da sinalização via EGFRvIII ativaria a via de sinalização PI3K-AKT-mTOR com consequente acetilação de histonas, o que facilita uma configuração de cromatina aberta para promover a expressão gênica e progressão tumoral (Masui *et al*., 2020)

A avaliação da mutação no IDH se mostra de grande importância, uma vez que, na pratica clínica será possível identificar o glioblastoma em sua forma precoce,

mesmo quando não apresenta as características de alto grau por imagem ou histopatologia (Wesseling e Capper 2018). Por outro lado, alguns autores discordam dessa nova classificação, uma vez que, o tratamento padrão para essa neoplasia, independentemente de ser primário ou secundário, se baseia na utilização de temozolamida (TMZ), que não depende do status da IDH do tumor. Os pesquisadores defendem que a identificação da metilação do gene promotor da enzima O6-metilguanina-DNA metil-transferase (MGMT) seria um fator de prognóstico mais útil em pacientes com GBM (Sonoda 2020).

1.4 Tratamentos Padrão

O GBM é um dos tumores de tratamento mais desafiador, considerado incurável. A cirurgia continua sendo a primeira escolha para reduzir o volume do tumor, desde que, a ressecção seja benéfica e não comprometa áreas importantes do cérebro. A cirurgia sozinha tem a capacidade de aumentar em apenas 3 a 6 meses a sobrevida dos pacientes, sendo então associada, sempre que possível, à radioterapia e/ou quimioterapia (McGirt *et al*., 2009). Atualmente a radiação seguida de temozolamida (TMZ), um agente alquilante de uso oral, tem sido utilizado como tratamento padrão para GBM, estendendo a sobrevida dos pacientes para 14 a 16 meses (Stupp *et al*., 2014). Apesar dos avanços científicos e tecnológicos das últimas décadas, pouco se avançou em relação a tratamentos efetivos para GBM.

A radioterapia é iniciada em 3 - 6 semanas após a cirurgia, dependendo da recuperação do paciente, geralmente se aplica uma dose total de 60Gy em frações diárias de 2Gy, 5 vezes na semana durante 6 semanas para pacientes com idade inferior a 70 anos. Para pacientes com idade superior é recomendado radioterapia

hipofracionada, uma vez que a radioterapia convencional não demonstra ser eficiente para essa faixa etária (Sulman *et al*., 2017).

A TMZ foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2005 (Stupp *et al*., 2014), no Brasil a aprovação ocorreu em 2011 pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em relação ao uso de TMZ por pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS), cabe aos hospitais credenciados no SUS a sua padronização de medicamentos oncológicos, ou seja, a partir do momento que o hospital é habilitado para prestar assistência oncológica pelo SUS, a responsabilidade pelo fornecimento do medicamento antineoplásico é desse hospital, seja ele público ou privado, com ou sem fins lucrativos (Ministério da Saúde Nota Técnica 2721 de 2018.)

O tratamento com a TMZ é realizado por via oral iniciando com uma dosagem diária de 75 mg/m^2 por seis semanas, de forma concomitante com a radioterapia. Em seguida, e de forma adjuvante, são administradas doses de 150 – 200 mg/m^2 por cinco dias em intervalos de 28 dias durante 6 ciclos, denominada fase de manutenção. Em alguns casos o tratamento com TMZ pode durar mais de um ano (Stupp *et al*., 2014). A TMZ é um pró-fármaco que sofre uma hidrólise espontânea no plasma, gerando o metabólito ativo MTIC (5-[3-metiltriazeno-1-il]imidazol-4-carboxamida), o efeito citotóxico deriva da metilação de sítios específicos do DNA, ocorrendo com mais frequência as posições N-7 ou O-6 dos resíduos de guanina, causando danos ao DNA que podem levar à morte celular nas fases G2/M (Strobel, Baisch e Fitzel *et al*., 2019). A adição da TMZ melhorou a sobrevida média de 12,1 para 15,6 meses e sobrevida global em 5 anos de 1,9% para 9,8%. A TMZ sozinha não tem capacidade de aumentar significativamente a sobrevida dos pacientes,

demonstrando a importância da associação entre radioterapia e quimioterapia (Stupp *et al*., 2005).

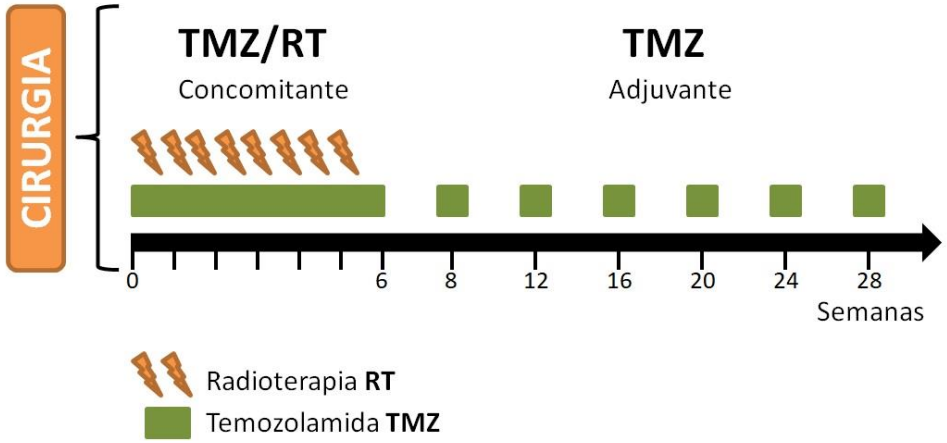


Figura 2: Esquema de tratamento padrão para pacientes recém diagnosticados com GMB. Após a cirurgia, a radioterapia é iniciada concomitantemente com a TMZ por 6 semanas, após é iniciada a administração de TMZ de forma adjuvante por 5 dias, com intervalo de 28 dias por 6 ciclos completos. (Adaptado de Holdhoff e Grossman 2011.)

A enzima MGMT, de reparo ao dano no DNA, desempenha um papel significativo na resistência à TMZ. Antes de se iniciar o tratamento com TMZ deve-se observar os níveis de metilação do gene promotor da MGMT, uma vez que, pacientes que apresentam metilação desse gene possuem um silenciamento a nível epigenético dessa enzima, diminuindo a capacidade de reparo do DNA e consequentemente aumentando a suscetibilidade à TMZ (Yu *et al*., 2020). Um estudo de fase III, em uma análise secundária dos dados, demonstrou que pacientes com a metilação do gene promotor da MGMT, quando tratados com TMZ, tem um aumento de sobrevida de 21,2 meses comparado a 14 meses dos que não possuem metilação, comprovando que o status de metilação da MGMT é um fator prognóstico para esses pacientes (Gilbert *et al*., 2013). Para pacientes sem metilação no promotor o tratamento com TMZ é desaconselhado, devendo ser feito com outros quimioterápicos, normalmente utilizando Carmustina ou esquema PVC (Procarbazina, Lomustina, Vincristina) (Stewart 2002).

Independente da terapia padrão adotada grande parte dos pacientes irá evoluir invariavelmente ao óbito ou recidiva. Esse prognóstico ruim se deve, em parte, à resistência desenvolvida por esses tumores aos tratamentos disponíveis e o desenvolvimento de mecanismos para o efluxo de drogas, demonstrando a necessidade de estudos que tentem esclarecer os mecanismos envolvidos nesse processo.

Ainda são necessários muitos estudos para definir as melhores abordagens terapêuticas para o tratamento do GBM. Usando buscas no '*clinicaltrials.gov*' (base de dados da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos, que contém estudos clínicos conduzidos em todo o mundo), existem 1500 estudos para glioblastoma registrados no mundo todo. Quando pesquisado para o Brasil, existem apenas 9 estudos, sendo que, apenas 1 está em andamento. Essa discrepância demonstra a necessidade do país em desenvolver sua pesquisa básica e assim progredir para os ensaios clínicos.

1.5 Tratamentos não padrão e inovadores

GMB recorrente e resistente à TMZ pode ser tratado com Bevacizumabe, um anticorpo monoclonal que inibe a ação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), de forma a inibir a angiogênse tumoral e consequentemente seu crescimento. Apesar de ter seu uso aprovado para o tratamento de GBM recorrente, o Bevacizumabe não aumenta significativamente a sobrevida global dos pacientes quando comparado a Lomustina (Wick *et al*., 2017 e Gramatzki *et al*., 2018). Em pacientes com GBM recém diagnosticado, demonstrou não aumentar a sobrevida global quando comparado ao tratamento padrão, além de estar associado a uma

maior chance de eventos adversos, não sendo recomendado na prática clínica nesses casos (Gilbert *et al*., 2014).

Nimotuzumabe é um anticorpo monoclonal que inibe EGFR, receptor altamente expresso em GBM, que facilita a angiogênese e a divisão celular (Solomon *et al*., 2013). Estudos de fase III não demonstraram um aumento na sobrevida global de pacientes tratados com Nimotuzumabe, TMZ e RT quando comparado aos que receberam TMZ e RT, mas curiosamente apresentou uma maior eficácia em pacientes sem metilação no gene da MGMT (perfil de resistência) (Westphal *et al*., 2015).

“Tumour-treating fields” (TTF) é um novo método de tratamento não invasivo destinado a inibir o crescimento tumoral com o auxílio de campos elétricos alternados em uma frequência de 100 a 200 kHz aplicados a partir de matrizes fixadas na cabeça dos pacientes, a qual deve estar raspada. A terapia TTF pode ser auto-administrada, recomendado por 18 horas diárias durante a fase de manutenção da TMZ (Mittal *et al*., 2018). Em um estudo de fase III o tratamento com TTF foi capaz de aumentar a sobrevida média para 20,9 meses, enquanto que, para TMZ sozinha foi de 16 meses. TTF demonstra eficácia e boa tolerabilidade com poucos efeitos adversos observáveis, mas possui um alto custo associado, normalmente não coberto pelos planos de saúde dificultando a adesão (Zhu *et al*., 2017).

Dentre as terapias mais promissoras na área do câncer, estão sem dúvida, as imunoterapias, em especial os inibidores de "*checkpoint*", que já demonstraram eficácia no tratamento de diversos tumores sólidos, como câncer de pulmão, próstata, mama, colorretal, renal, pancreático e melanoma (Johnson *et al*., 2017). Essa terapia se baseia na inibição de receptores de superfície e/ou seus ligantes, que regulam negativamente os linfócitos T, diminuindo sua capacidade de montar

uma resposta antitumoral robusta. Em células normais essas vias são necessárias para atenuar respostas auto-imunes, mas no câncer promovem um escape tumoral à resposta imune. Os inibidores de *checkpoint* mais estudados incluem; Ipilimumabe, inibidor da Proteína-4 Associada a Linfócitos T Citotóxicos (CTLA-4), Nivolumabe, inibidor da Proteína de Morte Celular Programada 1 (PD-1), presente nos linfócitos T citotóxicos e Atezolizumabe, um inibidor do Ligante de Morte Programada 1 (PD-L1) presente em células normais e tumorais (Desai *et al*., 2019). Infelizmente, os resultados iniciais dos inibidores de *checkpoint* para glioblastoma não corresponderam às expectativas (Kelly *et al*., 2020). Um estudo de fase I com pacientes de glioblastoma recorrente tratados com Nivolumabe sozinho ou em combinação com Ipilimumabe, a sobrevivência média foi de 10,4 meses com Nivolumabe sozinho e 7,3 meses para Nivolumabe combinado com Ipiliumabe, além disso, a combinação não foi bem tolerada por 20% dos pacientes, levando a descontinuação (Omuro *et al*., 2018). Um estudo de fase III demonstrou que Nivolumabe não melhora a sobrevida quando comparado com o Bevacizumabe, (inibidor de VEGF) aprovado para tratamento de glioblastoma recorrente (Reardon *et al*., 2017). Alguns autores vêm atribuindo as falhas de sucesso dos inibidores de *checkpoint* ao uso concomitante de glicocorticóides, que estariam suprimindo a ativação dos linfócitos (Kelly. W.J. e Gilbert. M. 2020) outros autores, alegam que a grande concentração de adenosina presente nesses tumores está causando imunossupressão e que a inibição das vias adenosinérgicas serão indispensáveis para os tratamentos oncológicos no futuro (Chen *et al*., 2019).

Como foi demonstrado nos parágrafos anteriores, nenhuma terapia, por mais promissora, conseguiu aumentar a sobrevida média em mais de dois anos. Existem vários desafios envolvidos no tratamento de pacientes com GBM que podem

explicar os insucessos das terapias. Está cada vez mais claro que o glioblastoma otimiza seu microambiente tumoral para ativar vias de sinalização celular e assim promover angiogênese, resistência celular, ativo efluxo de drogas no SNC, imunossupressão, migração e invasão do parênquima. Algumas dessas vias de sinalização, tão bem orquestradas pelo glioblastoma, serão discutidas nos tópicos que seguem.

1.6 Sistema Purinérgico

A sinalização purinérgica é uma rota de sinalização comum entre células, que compreende os nucleotídeos (principalmente trifosfato de adenosina, ATP) e nucleosídeos (principalmente adenosina) como sinalizadores extracelulares neuronais e não neuronais, onde estes podem desenvolver diferentes respostas de curto e longo prazo mediado por receptores específicos (Burnstock, 2007).

O ATP bem como seus derivados são moléculas sinalizadoras encontradas em diversos organismos e desenvolvem suas respostas no meio intracelular como molécula energética das células, substrato de enzimas e sinalizador para diversas vias metabólicas (Burnstock, 2006). Essas moléculas podem ser liberadas para o meio extracelular por diferentes mecanismos fisiológicos, como: exocitose, difusão, por transportadores específicos ou extravasadas devido à lise celular, em condições patológicas (Verkhrasky *et al*., 2009). Quando se encontram no meio extracelular, participam de inúmeros processos biológicos, incluindo neurotransmissão, contração de músculo liso, resposta imunológica, agregação plaquetária, dor, inflamação entre outras funções (Burnstock, 2007). Já é bem demonstrado na literatura, que além dos processos fisiológicos citados anteriormente, o ATP pode estimular a mitogênese e a

proliferação celular (Lemmens *et al*., 1996) bem como, causar efeitos citostáticos e citotóxicos em células tumorais (Dombrowski *et al*., 1993).

Após a liberação para o meio extracelular, o ATP e outros nucleotídeos são metabolizados aos seus respectivos nucleosídeos pela ação das ecto-nucleotidases, essas enzimas estão presentes na membrana celular e desempenham um importante papel na regulação da concentração dos nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular, consequentemente, regulam as respostas biológicas mediadas pelos purinoreceptores (Lemmens *et al*., 1996).

A família das ecto-nucleotidases é composta pelas seguintes enzimas: E-NTPDases (ecto-nucleosideo trifosfato difosfoidrolases), as E-NPPs (ecto-nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases), fosfatase alcalinas e a ecto-5'-nucleotidase (e5NT/CD73), a qual catalisa a última etapa dessa via, hidrolisando o AMP até adenosina (Zimmermann, 2012).

A família das E-NTPDases, é composta por oito membros, que foram nomeados NTPDases1-8. As NTPDase1,2,3 são expressas no cérebro de mamíferos e diferem pela preferência ao substrato, como por exemplo, podemos citar a NTPDase1, hidrolisa igualmente nucleosídios di- e tri-fosfatados, já a NTPDase2, demonstra uma clara preferência por nucleosídeos tri-fosfatados. O ATP extracelular também pode ser metabolizado diretamente a AMP pela ação das E-NPPs, essa família é constituída por 7 enzimas, mas apenas NPP1-3 estão envolvidas na sinalização purinérgica (Bergamin *et al.,* 2012).

A etapa final da hidrolise do ATP é catalisada pela e5NT/CD73, gerando adenosina a partir do AMP resultante da hidrólise do ATP e ADP pela ação das E-NTPDases ou NPPs (Bergamin *et al.,* 2012). A adenosina liberada exerece seus efeitos via ativação de receptores específicos e pode ser metabolizada à ionosina

pela ação da ecto-adenosina desaminase (ADA) ou ainda ser captada pelas células para a via de salvação das purinas.

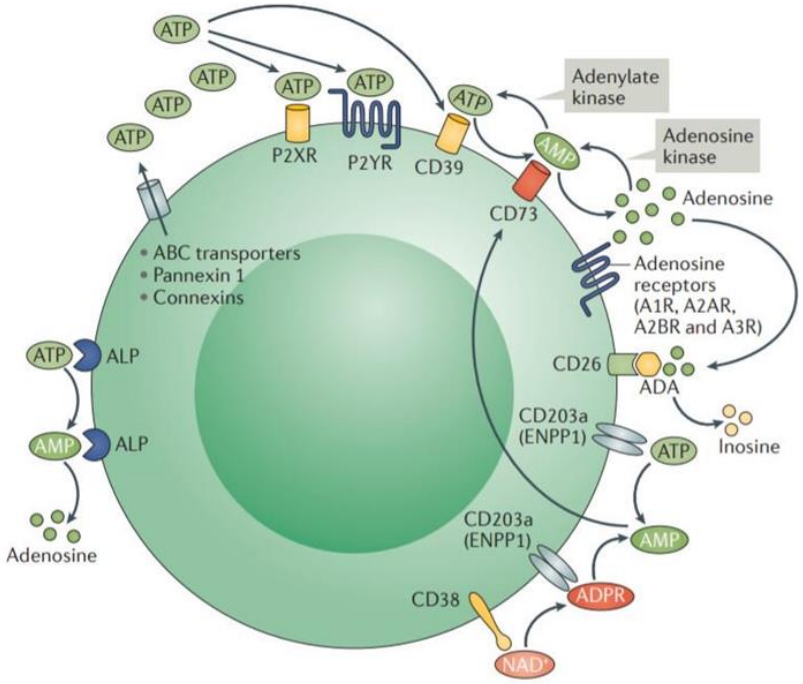


Figura3: Visão geral da sinalização purinérgica. O sistema purinérgico é composto pelos receptores P_{2X}, P_{2Y} e P_1, e pela família das ecto-nucleotidases que está representada pela NTPDase-1 (CD39), ENPPs, Fosfatase Alcalina (ALP) e a ecto-5'-nucleotidase (CD73). O ATP pode ser liberado da célula por diversos mecanismos e no meio extracelular pode atuar nos receptores P_{2X} ou P_{2Y} ou, ainda, ser hidrolisado pelas ecto-nucleotidases até adenosina. A adenosina pode atuar nos receptores P1 (A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3) ou retornar ao citoplasma celular pelos transportadores de nucleosídeo (não mostrado) ou, ainda, ser desaminada e metabolizada por ação da ADA. (adaptado de Vijayan *et al*., 2017)

Essas moléculas sinalizadoras, geradas pelas ecto-nucleotidases, têm seus efeitos mediados através da interação com diferentes receptores presentes na membrana das células, denominados purinoreceptores (Burnstock, 2007). Cada receptor possui uma sensibilidade específica aos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Existem caracterizadas duas famílias de receptores, os receptores P1 e P2. Os receptores P1 são ligantes de adenosina e são divididos em 4 grupos: A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3, todos acoplados à proteínas G. Estes receptores diferem entre si pela concentração de adenosina necessária para ativar cada receptor, sendo A_1 e A_{2A}, de alta afinidade, ativados em baixas concentrações (Kd 70 e 150nM,

respectivamente) e A_{2B} e A_3 de baixa afinidade, ativados apenas por altas concentrações de adenosina (Kd 5100 e 6500nM respectivamente). O tipo de proteína G acoplada também difere entre os receptores. A_{2A} e A_{2B} estão ligados à proteína G estimulatória (G_S), aumentando os níveis de AMP_C e os receptores A_1 e A_3 estão ligados a proteína G inibitória (G_{i0}), inibindo a enzima adenilato ciclase e diminuindo os níveis de AMP_C (Jacobson *et al.,* 2006).

Os receptores P2 são sensíveis principalmente ao ATP/ADP e são subdivididos em duas grandes famílias: P2X: canais iônicos dependentes de ligante (receptores ionotrópicos) e P2Y: metabotrópicos, acoplados a proteínas G. Os receptores P2X são sensíveis ao ATP e até o momento foram identificados sete exemplares dessa família ($P2X_1$ - $P2X_7$). Os P2Y são sensíveis à ATP, ADP e UTP e foram identificados oito membros da família dos receptores P2Y ($P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}$) (Zimmermann, 2006 e Burnstock 2007).

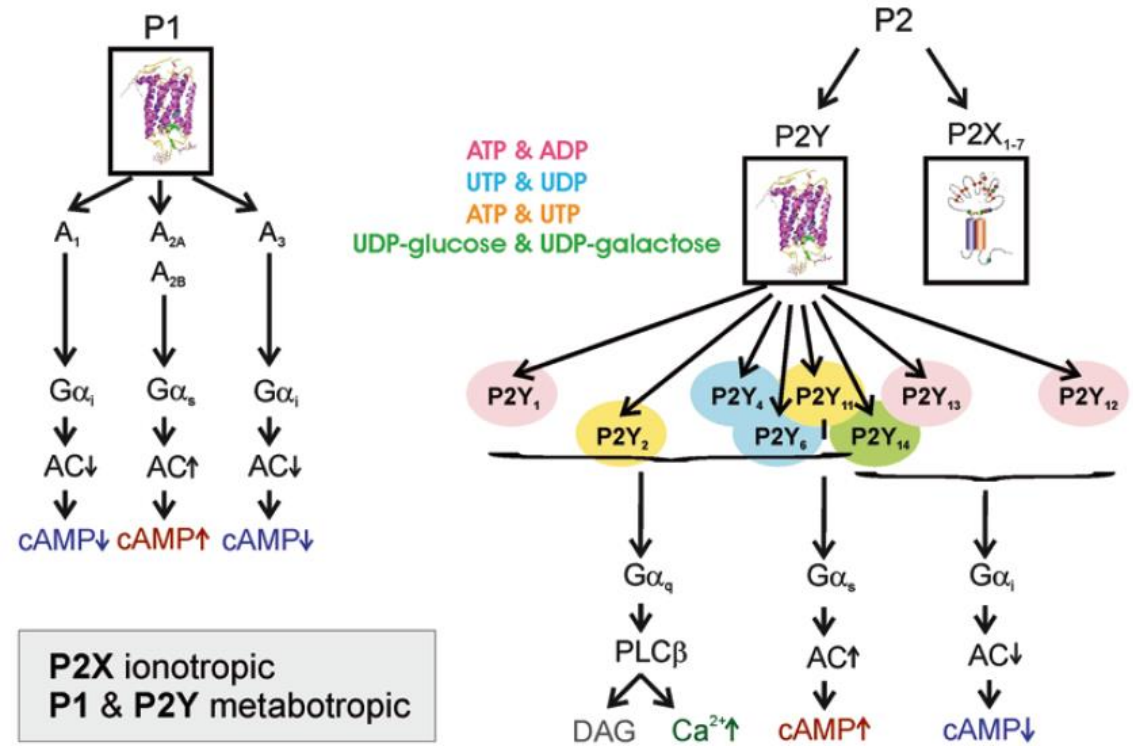


Figura 4: Receptores Purinérgicos P1 e P2, com ênfase no subtipo de proteína G acoplada aos receptores metabotrópicos. (Adaptado de Glioma Signaling 2ª ed, 2020)

1.7 Ecto-5'-nucleotidase e o Câncer

Como descrito acima, a e5NT/CD73 hidrolisa o AMP até adenosina. Esta enzima está acoplada à membrana plasmática por uma âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol (GPI). O sítio de catálise está voltado para o meio extracelular e sua atividade é dependente de cátions divalentes, como o Mg^{2+}, podendo ser inibida competitivamente por ADP, ATP e 5'-α,β-metileno-ADP (APCP), o qual é um análogo de ADP não metabolizável (Zimmermann, 2001). A e5NT/CD73 é altamente expressa em diversos tumores sólidos, tais como: carcinoma mamário (Cambolat *et al*, 1996), cólon, pulmão, ovário (Su *et al*, 2001) e gliomas (Bardot *et al*, 1994; Bavaresco *et al.,* 2008) e seus níveis de expressão podem ser relacionados com a malignidade do tumor (Spychalla 2000). A adenosina formada pela e5NT/CD73 desempenha um importante papel no escape-imuno tumoral, na angiogênese e na resistência tumoral. Além da função enzimática a e5NT/CD73 pode atuar como parte da adesão e interação com a matriz extracelular (MEC), mediando o poder de invasão e as propriedades metastáticas dos tumores, portanto, tanto as funções enzimáticas como não enzimáticas da e5NT/CD73 estão envolvidas com a progressão do câncer (Zhou *et al*, 2019).

Em relação ao desenvolvimento tumoral promovido pela e5NT/CD73, é descrito na literatura, para um modelo de melanoma, que a superexpressão de e5NT/CD73 em células tumorais pode promover o crescimento tumoral *in vivo* e por outro lado camundongos deficientes de CD73 tem um crescimento tumoral atenuado (Yegutkin *et al*., 2011). Além disso, estudos demonstraram que o aumento da expressão de e5NT/CD73 em pacientes com câncer de colorretal estava associada a um pior prognóstico (Wu *et al*., 2012). Em nosso grupo de pesquisa, desenvolvemos diversos trabalhos em relação aos gliomas e e5NT/CD73, que

corroboram com as deduções apontadas anteriormente. Verificamos que gliomas apresentam um aumento da atividade da e5NT/CD73, comportamento oposto às células análogas normais, os astrócitos (Wink *et al.,* 2003). Demonstramos também que quando tratados com ATP e adenosina, diferentes linhagens de glioma aumentam sua proliferação (Morrone *et al.,* 2003). E comprovamos efetivamente a relação da e5NT/CD73 no processo de sobrevivência e propagação dos gliomas (Bavaresco *et al*., 2008). Todas as evidências citadas anteriormente demonstram a estreita relação entre a expressão da e5NT/CD73 e a malignidade de tumores originados da glia.

1.8 Ecto-5'-nucleotidase e sua função protéica

Quando uma célula tumoral adquire um fenótipo que chamamos "invasivo", significa que essa célula diminui sua habilidade de adesão célula-célula e aumenta sua capacidade de migração, características que também são pré-requisitos para a metástase (Coussy et al., 2019). A e5NT/CD73 tem suas atividades enzimáticas e não-enzimáticas relacionadas a malignidade de diversos tumores. Quando falamos sobre funções não enzimáticas, estamos relacionando as atividades desenvolvidas pela CD73 apenas como proteína, sem a necessidade de ativação e que não é inibida com o bloqueio do centro catalítico. Por ser uma proteína ancorada na membrana das células a e5NT/CD73 tem a capacidade de modificar a interação célula-célula e de interagir com a MEC, um fator importantíssimo no processo de invasão e metástase de tumores (Hu *et al*., 2019). A literatura disponível na atualidade tem demonstrado essa estreita relação. Um estudo coordenado por Zhao-Wei Gao na china, demonstrou que a e5NT/CD73 promove a migração em células de câncer cervical pelo aumento da sinalização das vias EGFR/Akt e VEGF/Akt e

que essa migração não é diminuída com o uso de APCP (inibidor específico da atividade enzimática da e5NT/CD73) (Gao *et al*., 2017). Outro estudo identificou a e5NT/CD73 como reguladora chave na transição epitélio-mesenquimal no câncer de vesícula biliar, ajudando a promover a invasão das células tumorais (Xiong et al., 2014). Utilizando linhagens de melanoma, Sadej e colaboradores (2012) observaram que a função enzimática da e5NT/CD73 estaria envolvida principalmente com o processo de invasão e a ação não enzimática promovendo a migração, demonstrando que a e5NT/CD73 atuaria em diferentes estágios da metástase. Estudos *in vivo* também demonstram essa associação, um trabalho realizado por Stagg e colaboradores (2011), verificou que camundongos deficientes de e5NT/CD73 eram resistentes a modelos de metástases de pulmão e que a ausência de e5NT/CD73 estava relacionada com um aumento das células T efetoras nos sítios tumorais. Seguindo a mesma linha, outro estudo realizado na Finlândia relatou que camundongos deficientes de e5NT/CD73 tinham a progressão e formação de metástases diminuída para um modelo de melanoma (Yegutkin *et al*., 2011). Já no cenário dos estudos com humanos, um estudo de coorte retrospectivo de pacientes com melanoma, relacionou o aumento de mRNA da e5NT/CD73, por regulação epigenética, com a maior chance de metástases nas vísceras e no cérebro (Wang *et al*., 2012). Todas as evidências citadas anteriormente demonstram que a e5NT/CD73 contribui significativamente para o processo de invasão e metástase em diversos tumores. Entretanto, as vias de sinalização envolvidas durante esse processo ainda não foram completamente elucidadas. Alguns demonstram ser independente da atividade enzimática e formação de adenosina, estando relacionado com o aumento da sinalização das vias EGFR/Akt e VEGF/Akt (Gao *et al*., 2017). Por outro lado, foi demonstrado que a promoção da migração ocorre via

adenosina e ativação do receptor A_{2B} promovendo o aumento da expressão de MMP2, MMP9 e Vimentina (Azambuja *et al.,* 2018). É importante perceber nesse ponto que uma possibilidade não exclui a outra, podendo atuar de forma complementar.

No contexto dos gliomas, sabemos que esse tipo tumoral é localmente invasivo desde o início da doença e progressivamente torna-se intercalado com o parênquima cerebral normal, o que torna a ressecção completa tecnicamente impossível. De maneira geral os gliomas permanecem como tumores locorregionais, sendo as metástases extremamente raras, ocorrendo em torno de 0,5% dos casos e normalmente após a cirurgia, mas metástases espontâneas podem acontecer (Cunha e Maldaun 2019). Apesar de raro, os gliomas malignos são capazes de crescer em locais que não o cérebro. Acredita-se que um dos motivos para essa baixa observação de formação de metástases seria a sobrevida tão curta desses pacientes, não sendo um tempo hábil suficiente para as células metastizarem para sítios extracraniais (Beauchesne 2011). As metástases oriundas de GBM normalmente ocorrem nos linfonodos, ossos, fígado e pescoço, sendo o fígado o sítio com o pior prognóstico. Ainda não se compreende bem o contexto no qual ocorrem as metástases pelos gliomas, nem o motivo pelo qual esse tumor é tão invasivo mesmo nos estágios iniciais da doença (Cunha e Maldaun 2019). Se faz necessário entender melhor os mecanismos envolvidos no processo de migração e invasão tecidual a partir da transição epitélio-mesenquimal para então compreender os passos seguintes da metástase.

1.9 Ecto-5'-nucleotidase e sua função enzimática na resistência a drogas

Por possuir uma taxa de crescimento acelerada, o crescimento do GBM não coincide com um aumento de nutrientes e oxigênio para manutenção das células cancerígenas. A formação de novos vasos sanguíneos ocorre lentamente, o que limita o fornecimento de oxigênio e nutrientes a certas zonas do tumor. Como consequência, parte do tecido tumoral torna-se hipóxico e necrótico, criando um nicho para a liberação de diversos fatores que modulam o comportamento das células vizinhas (Bar EE. 2011). Essa afirmação pode parecer controversa, pois quando observado histologicamente o GMB é altamente vascularizado, o que ocorre é que a vascularização de um tumor sucede de forma desorganizada, apresentando anomalias graves na formação de vasos sanguíneos, incluindo oclusão e a presença de um fluxo sanguíneo lento e ineficiente (Dewhirst *et al*., 1996 e Vaupel *et al*., 1989)

Vários estudos mostraram que a hipóxia promove quimiorresistência em células de GBM através da expressão de proteínas e ativação de múltiplos mecanismos de resistência a drogas. Foi observado, por exemplo, que a proteína pró-apoptótica Bad sofre modificação em condições hipóxicas e altas concentrações de adenosina, isso protegeu as células de GBM contra os efeitos apoptóticos do paclitaxel (Merighi *et al*., 2007). Vias de inibição da apoptose devido a hipóxia também foram estudadas por Hsieh e colaboradores (2015), que evidenciaram que o microambiente hipóxico do tumor aumenta a expressão e função de Livina (proteina anti-apoptótica) promovendo escape da apoptose e resistência à radiação ionizante e temozolomida em GBM (Hsieh *et al*., 2015). Um estudo utilizando tecido de GBM de diferentes zonas do tumor, observou que existe um aumento da expressão da enzima prominin-1 (CD133) com consequente aumento da expressão de MGMT,

demonstrando que células de região de hipóxia são mais resistentes ao tratamento com TMZ quando comparadas com células da periferia (Pistollato *et al*., 2010).

Embora saibamos que existe uma relação entre baixa oxigenação e o desenvolvimento de quimioresistência em GBM, os mecanismos pelos quais esse fenômeno ocorre ainda não são completamente compreendidos. Por tanto, o estudo das vias que são ativadas durante a hipóxia é extremamente relevante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, dentre os sinais emitidos durante a hipóxia, os mediados por adenosina, parecem ter um papel fundamental, visto que a concentração desse nucleosídeo está aumentada nessas regiões (Kumar *et al*., 2013) e a sinalização mediada por adenosina já foi correlacionada com a ativação de mecanismos múltiplos de resistência a drogas (Uribe *et al*., 2017)

Com a finalidade de comprovar a relação da e5NT/CD73 com aumento dos níveis de adenosina e consequente desenvolvimento de quimioresietência, um estudo promoveu a inibição da e5NT/CD73 utilizando o APCP. Ao promover a inibição os autores deste trabalho verificaram uma diminuição da expressão e da atividade de MRP1 (proteína associada à resistência a multidrogas 1) o que resultou em aumento de sensibilidade à Vincristina. Eles observaram também que o receptor A_3 apresentou o maior nível de expressão dentre os quatro receptores de adenosina, e sua inibição produziu uma diminuição da expressão e atividade do MRP1 (Quezada *et al*., 2013). Um estudo *in vivo* realizado nos EUA demonstrou que camundongos deficientes de e5NT/CD73, em um modelo de GBM, desenvolviam tumores de tamanho reduzido, com menos vasos sanguíneos e menos invasivos e que esses tumores tinham uma expressão reduzida em 20x do receptor A_{2A} quando comparado com o grupo controle. Além disso, também verificaram que ao inibirem o

receptor A_{2A} as células tumorais tornavam-se mais sensíveis ao tratamento com TMZ (Yan *et al*., 2019). Outro estudo *in vivo*, verificou que para um modelo de câncer de mama triplo-negativo a superexpressão de e5NT/CD73 estava relacionada ao desenvolvimento de resistência a Doxorubicina via ativação de A_{2A} e que o bloqueio da e5NT/CD73 promoveu aumentos dos efeitos esperados para este fármaco e prolongou a sobrevida dos camundongos (Stagg *et al*., 2010). Portanto, considerando todas as evidências presentes na literatura, as vias adenosinérgicas representadas por: CD73/A_3/A_{2A}/MRP1 podem ser postuladas como potencial alvo terapêutico em células quimiorresistentes.

1.10 Cultivo celular utilizando células C6 de glioma de rato

O cultivo celular é amplamente utilizado na pesquisa básica por ser um modelo de execução simples e rápido e de baixo custo, que serve como teste precedente aos testes *in vivo,* permitindo refinar o modelo experimental e muitas vezes produzem resultados bioequivalentes.

As células da linhagem C6 foram desenvolvidas por Philipe Brenda em 1968, através da administração repetida de metilnitrosuréia em ratos *Wistar-Furth* adultos (Brenda et al, 1968). Essas células apresentam diversas semelhanças ao glioblastoma humano. Por exemplo, a nível histológico, quando implantadas em cérebros de ratos *Wistar* é possível verificar regiões de invasão do tecido cerebral, semelhante à infiltração difusa padrão observada no glioblastoma. Ao nível celular, tumores oriundos das células C6 produzem áreas de necrose, diversas áreas com polimorfismo nuclear e altas taxas de mitose (Chicoine e Silbergeld, 1995, Jacobs *et al.*, 2011). Com isso, as células da linhagem C6 têm sido muito utilizadas nos últimos anos como modelo de glioma para investigar e eficácia de novas terapias e

compreender melhor como os tumores se comportam e se desenvolvem (Jacobs *et al.,* 2011)

É demonstrado que a célula C6 muda suas características de acordo com o número de passagens em cultura. As células C6 de altas passagens exibem morfologia, resposta a estímulos, taxa de crescimento e expressão de proteínas diferentes da C6 de baixa passagem (Parker *et al.,* 1980). Foi verificado que em C6 de baixa passagem, a enzima fosfohidrolase cíclica, marcadora de oligodendrócito, é altamente expressa, em oposição à glutamina sintetase (GS), marcadora de astrócitos, que é pouco expressa. Essa relação se inverte para C6 de alta passagem, comprovando que essas células exibem propriedades astrocitárias com o aumento das passagens (Mangoura *et al*., 1989). Foi descrito também que C6 de baixa passagem são mais glioblásticas e menos diferenciadas quando comparadas com a de alta passagem (Mangoura *et al.,* 1989). As células C6 de alta passagem apresentam elevados níveis de atividade de GS e elevada secreção de S100B, essas propriedades bioquímicas também são exibidas em cultura primária de astrócito (Kazazoglou *et al*., 1996 e Quincozes-Santos *et al.,* 2010). Portanto, as células de glioma C6 de baixa passagem tem sido amplamente utilizadas como modelo de glioblastoma, em oposição, às células C6 de alta passagens têm sido descritas na literatura como um bom modelo de astrócito para investigar o ciclo de glutamato-glutamina, a secreção glial de neuromoduladores e os transportadores de aminoácidos excitatórios (Leivas *et al*., 2014).

2. OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

Diante dos dados apresentados e considerando que células C6 de alta passagem quando implantadas em cérebros de ratos desenvolvem tumores menores do que células C6 de baixa passagem (Campesato, 2010), o presente trabalho visa investigar se há diferença nos parâmetros de malignidade celular e na atividade e expressão da e5NT/CD73 nas células de glioma C6 de alta passagem em relação às células C6 de baixa passagem, bem como, a relação da e5NT/CD73 com a resistência celular em linhagens de glioma humano em avaliações de curto e longo prazo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar o perfil de hidrólise do ATP, ADP e AMP nas células C6 de alta e de baixa passagem;
2. Verificar a expressão proteica da e5NT/CD73 e das NTPDases nas células C6 de alta e baixa passagem;
3. Verificar a capacidade proliferativa das células C6 de alta e baixa passagem;
4. Avaliar o comportamento das células C6 de alta e baixa passagem em ensaios de malignidade *in vitro* de adesão e migração;
5. Verificar o perfil de sensibilidade das células U138 e U251 frente à temozolamida;

6. Verificar as concentrações de APCP necessárias para inibir a atividade da e5NT/CD73 por pelo menos 24 nas células U138 e U251;

7. Avaliar se a inibição da e5NT/CD73 modifica o perfil de sensibilidade à TMZ nas linhagens U138 e U251 em avaliações de curto e longo prazo;

PARTE II

3. RESULTADOS

Os resultados serão descritos em dois capítulos aos quais correspondem a um artigo original a ser submetido para publicação e dados originais (Capítulo I e II)

CAPÍTULO I

Title: Analysis of e5NT/CD73 enzymatic and proteic profile in early and late passaged C6 glioma cells grown in vitro and in vivo

Authors: Fabiana M. Manica[1], Luis Felipe I. Campesato[1], Juliete N. Scholl[1], Elizandra Braganhol[1], Leticia S. Bergamin[1], Maria Isabel A Edelweiss[2], Jean Sevigny[3], Fabrício Figueiró[1,4] e Ana M. O. Battastini[1].

Affiliations: [1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. [2]Departamento de Patologia, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. [3]Centre de recherche du CHU de Québec - Université Laval, Québec City, Canada. [4]Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author:

Dra. Ana Maria Oliveira Battastini (abattastini@gmail.com) and Fabiana de Mattos Manica (manicafabiana@gmail.com) Departamento de Bioquímica, ICBS/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre/RS, 90035-003, Brasil. Phone: +55 51 3308-5553.

Analysis of e5NT/CD73 enzymatic and proteic profile in early and late passaged C6 glioma cells grown in vitro and in vivo

Abstract

Background/Objectives: Glioblastoma (GBM) is a very aggressive tumor that presents a high proliferative and invasive behavior. Ecto-5'-nucleotidase (e5NT/CD73) is a widely expressed enzyme that hydrolyses extracellular AMP, producing adenosine, an important molecule in several cell functions. Besides that, e5NT/CD73 has been shown to exert an important role in cell-cell and cell-matrix interactions. Several evidences suggest that e5NT/CD73 has tumor-promotion functions, being up-regulated in several tumors. A variety of researchers have used C6 cells to model of GBM. However, it has been demonstrated that this lineage suffers several morphological and biochemical alterations according to the number of passages in culture. In this study we aimed to compare the expression and activity of e5NT/CD73 in early (EPC6) and late (LPC6) passage C6 cells and parameters of malignancy in both cells. **Methods:** Activity and expression of e5NT/CD73 and NTPDases were analyzed in EPC6 and LPC6 through methods such as malachite-green and flow cytometry. We also assessed parameters of malignancy *in vitro*, such as cell adhesion, migration and proliferation. For a deeper investigation, we implanted EPC6 and LPC6 in rat striatum and performed pathological analyses to assess tumor size and malignancy. **Results**: LPC6 presented a large reduction in expression and AMPase activity of e5NT/CD73. LPC6 were more proliferative in 72h of experiment, but after 144h seems to match. This result was confirmed in colonial assay, where EPC6 formed more colonies than LPC6. A significant alteration in migration parameter of LPC6 cells was observed *in vitro* possibly due to the loss of the migration function of e5NT/CD73 *per se*. In addition, LPC6 cells developed small tumor mass in the striatum of rats, which was confirmed by immunohistochemistry analyses, whereas all rats injected with EPC6 cells developed tumors with all histopathological features of GBMs. **Conclusion:** Taken together these results reinforce the crucial involvement of purinergic signaling in the GBM progression. Further studies are necessary to establish new and powerful therapies against these tumors using e5NT/CD73 as target.

Introduction

Malignant gliomas comprise a heterogeneous group of primary central nervous system (CNS) tumors that originate from glial cells or their progenitor cells [1]. Glioblastoma (GBM), classified as grade 4, represents the most aggressive of these tumors [2]. GBM normally present a fast-growing and angiogenic phenotype as well as great potential to invade surrounding normal brain tissue, what severely limit therapeutic alternatives and the efficacy of current treatments causing a short survival of only 15 months after diagnosis [1, 3].

Several proteins and cell signalling pathways involved in GMB progression have been described [4, 5] in this study we focus on ecto-5′-nucleotidase (e5NT/CD73). Ecto-5'-nucleotidase, also known as CD73, is a widely distributed 70-kDa molecule bound to the external side of the plasma membrane at lipid rafts through a g*lycosylphosphatidylinositol* (GPI) anchor [6]. ecto-5'-NT/CD73 catalyzes the hydrolysis of extracellular nucleoside monophosphates to its respective nucleosides (e.g. AMP $\rightarrow$ adenosine), and is the best-characterized enzymatic source of extracellular adenosine [7]. Besides its catalytic function, e5NT/CD73 has also been described as an important player on cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions, [8] as well as a modulator of T lymphocytes signaling via adenosine production [9].

e5NT/CD73 overexpression has been reported in many types of cancer cell lines and patient's biopsies including glioblastoma, breast cancer, colorectal cancer, ovarian cancer, gallbladder and gastric cancer being associated with clinical characteristics and prognosis of cancer patients [10]. Recent publications have shown a high connection between e5NT /CD73 expression with migration and

invasion potential. *In vitro*, e5NT/CD73 overexpression significantly promoted cervical cancer cells proliferation and migration, without reversion by APCP (α,β-methilene-ADP), an inhibitor of enzyme activity [11]. On the other hand, upregulation of e5NT/CD73 in T-47D, a breast cancer cell line, promoted cell migration and invasion through the e5NT/CD73 enzymatic activity [12]. In melanoma cells it was observed that the enzymatic function was primarily involved in invasion, whereas the nonenzymatic action of CD73 was a key regulator of epithelial-mesenchymal transition [13]. In an *in vivo* study it has been demonstrated that CD73-deficient mice are significantly protected against the development of subcutaneous tumors and experimental lung metastases [14]. In addition, another study demonstrated that CD73 is regulated by methylation in the *NT5E CpG island* and its upregulation is important to the metastatic potential of malignant melanoma [15]. Taken together, above results demonstrated that both enzymatic and nonenzymatic activity of e5NT/CD73 can contribute to tumor invasion and metastasis in many types of cancer and these functions are not completely independent of each other.

Malignant glioma cells are able to grow extra-cranially, but extracranial metastases of GBM are extremely rare, affecting 0.4–0.5% of all patients [16]. GBM are unique tumors; many are locally invasive from early in the disease course and progressively become interspersed with normal brain parenchyma [17]. The reasons why this tumor has been so aggressive from early in the disease course remain unclear. A large body of evidence suggests that GBM has high expression and activity of e5NT/CD73 and its enzymatic product, adenosine, has tumor-promotion functions [18]. The majority of glioma cell lines present an extracellular nucleotide metabolism that has high AMPase activity and e5NT/CD73 expression [19], in opposition, it was demonstrated from our research group that astrocytes, present low

AMPase activity and e5NT/CD73 expression [20]. Furthermore, ATP and adenosine induce proliferation of several glioma cell lines by purinergic receptors and the treatment with APCP significantly reduced glioma cell proliferation [21] demonstrating the importance of e5NT/CD73 and adenosine on tumor progression in glioma.

Taking these factors into account, e5NT/CD73 has emerged as an important component of glioma malignancy, however, its roles in migration and invasion have not been fully elucidated. Therefore, in this article, we used C6 rat glioma cell line in early (6-25 passages) and late (beyond 70 passages) passages, as an *in vitro* model of glioma and astrocytes, respectively [23] in order to compare the malignancy proprieties such as migration, invasion and proliferation.

Material and Methods

Cell Culture

The early passages (6-25 passages) C6 rat glioma cell line (EPC6) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA), and the late passages C6 (beyond 70 passages) (LPC6) were kindly donated by Dr. André Quincoses dos Santos, Biochemistry Department, UFRGS. Both grown in culture flasks and maintained in Dulbecco´s modified Eagle´s medium (DMEM) 5%, 8.39 mM HEPES (pH 7.4), 23.8 mM $NaHCO_3$, 0.1% amphotericin B, 0.5 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco BRL) and supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Brazil). Cells were kept at a temperature of 37^{o}C, humidity of 95% / 5% CO_2 in air.

Ecto-nucleotidases activity assay

The nucleotide hydrolysis was assayed as described by Wink *et al.* 2003 [19]. Briefly, 24-well plates containing glioma cells were washed three times with free-phosphate incubation medium. The enzymatic reaction was started by the addition of 200 μL of incubation medium containing 2 mM $CaCl_2$ (for ATP and ADP) or 2 mM $MgCl_2$ (for AMP) plus 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM Hepes (pH 7.4) and 1 mM of ATP/ADP or 2 mM of AMP, at 37 ^{o}C. After 30 min of incubation for ATP/ADP or 10 min for AMP, the reaction was stopped by taking an aliquot of the incubation medium, which was transferred to Eppendorf tubes containing trichloroacetic acid (5% final concentration, w/v) previously placed on ice. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the malachite green method [24], using KH_2PO_4 as a Pi standard. The non-enzymatic Pi released from the nucleotide into the assay medium without cells was subtracted from the total Pi released during the incubation, giving net values for enzymatic activity. All samples were run in triplicate. Specific activity is expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

Protein Determination

Cells in 24-well plates were solubilized with 100 μl NaOH (1.0 M) and frozen overnight. An aliquot was collected and protein was measured by the Coomassie blue method [25] using bovine serum albumin as standard.

Flow cytometry

All flow cytometry experiments were performed on FACS Calibur equipment (FACS Calibur, BD Bioscience, Mountain View, CA, USA), and the data obtained were analyzed with FLOWJO® software.

Ecto-nucleotidase protein staining

Cells was seeded in 6-well plates and grown for 72 h. A total of 3×10^5 cells were centrifuged and incubated with staining buffer [FBS 1% (v/v) in PBS] containing the primary antibody. NTPDase1: Rabbit anti-rat 1:400, NTPDase2: Rabbit anti-rat 1:80, NTPDase3: Rabbit anti-rat 1:100, CD73: Rabbit anti-rat 1:200 (http://ectonucleotidases-ab.com). The cells were incubated for 30 min on ice in the dark fallowed by 20 min incubation with anti-rabbit FITC secondary antibody (65-6111 Invitrogen, USA). After incubation, the cells were washed twice and immediately analyzed using flow cytometry.

KI67 staining

Cells were seeded in 6-well plates and grown for 2, 5 and 10 days. After culture, cells were tripsinized and suspended in PBS, a total of 3×10^5 cells were centrifuged and permeabilized and fixed with permeabilization / fixation solution (BD Biosciences, USA) for 40 minutes at 4.0˚C. Afterwards, cells were incubated with Ki67-FITC antibody (11-5698-82 Invitrogen, USA) for 30 minutes at room temperature. After incubation, the cells were washed twice and immediately analyzed using flow cytometry.

Cell Counting Assay

LPC6 and EPC6 were seeded at 5 × 10^4 cells/well in DMEM/5% FBS in 12-well plates. Following cellular growth and treatment (50µM AMP),the medium was removed, cells were detached with 0.25% trypsin solution (Gibco BRL, Carlsbad, USA) and counted with trypan blue exclusion. Data were expressed as the number of cells after 24, 48 and 72h.

Cell adhesion assay

Cells were seeded at density of 3 x 10^4 cells/well in 96-well plates and incubated for 1, 4 or 6h at 37^{o}C in a 5% CO_2 enriched atmosphere. The non-adherent cells were removed by washing with PBS. Adherent cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min, stained for 10 min with 100 µL 0.5% crystal violet diluted in 20% methanol, which was eluted in 100 µL 10% acetic acid (v/v). The optical density of each well was measured at 570 nm.

Clonogenic Assay

Cells were seeded at density of 100 cells by well in 6-well plates in triplicate and incubated for 10 days at 37^{o}C with a 5% CO_2 enriched atmosphere. After this time, the cells were fixed in ice cold 4% methanol and stained with 0.5% crystal violet diluted in 20% methanol. Resulted colonies were counted one by one and photographed for analysis.

Scratch-Wound assay

The Scratch-Wound assay was performed as described by Valster *et al* [26]. Briefly, 2 x 10^4 cells were seeded in 12-well plates until approximately 70% of

confluence. Then, one perpendicular scratch was made using a P200 pipette tip. The observation was made by using phase contrast microscopy in an inverted microscope. Images were taken at 0, 6, 12 and 24 hours using a 10x objective lens and analyzed by digitally drawing lines averaging the position of the migrating cells at the wounded edges. The migrated distance was determined by measuring the width of the wound divided by two and by subtracting this value from the initial half-width of the wound. Data were expressed as the percentage of migration.

Transwell migration assay

Cell migration was also evaluated by transwell migration assay using transparent PET membrane 24 well 8.0 µm pore size according manufactures protocol (ref 353097; Falcon, Corning, NY). Briefly, cells were plated in transwell chambers at density of 3 x 10^4 cells/cm^2 using serum free DMEM. Seven hundred microliters of 10% FBS DMEM was added to the lower chamber and cells were maintained at 37°C and 5% CO2. After 24h, non-migration cells in the upper chamber were removed with a cotton swab and the migration cells in the low chamber were fixed with 20% methanol for 15 minutes and then stained with 0.5% crystal violet diluted in 20% methanol for 10 minutes. Cells that migrated were photographed in four randomly selected fields for each membrane in triplicate and counted using the ImageJ software (National Institute of Health, Rock Ville Pike, Bethesda, MD).

Glioma implantation

Cells were cultured to approximately 70% confluence and a total of 1 x 10^6 cells in 3 µL DMEM with 5% FBS were injected in the right striatum at a depth

of 6.0 mm (coordinates with regard to bregma: 0.5 mm posterior and 3.0 mm lateral) of male Wistar rats (250–350 g, 8 weeks old) which were anesthetized by i.p. administration of ketamine and xilazine. After 20 days, the rats were decapitated and the entire brain was removed, sectioned and fixed with 10% paraformaldehyde (PFA) in PBS (pH 7.4). All procedures used in the present study followed the Principles of Laboratory Animal Care from NIH and were approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS.

Pathological analysis and tumor volume quantification

The fixed tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and sections (4 µm thick, paraffin embedded) of each tumor were analyzed by two independent pathologists, blinded for the experimental data. For tumor size quantification, images were captured using a digital camera connected to the microscope and analyzed using Image Tool Software™. The total volume (mm^3) of the tumor was computed by summing the segmented areas and by the multiplication of the slice resolution.

Statistical analysis

All experiments were performed at least three times. Data were expressed as mean ± SD and were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer post-hoc test (for multiple comparisons) or Student's t test as appropriate. Differences were considered significant for a p value <0,05 as following: *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p< 0.001.

Results

Early passaged C6 glioma cells (EPC6) present morphological differences and higher rate of AMP hydrolysis than late passaged cells (LPC6)

It has been known C6 lineage exhibits morphological and biochemical changes according to number of passages in culture [27]. Early passage (EPC6) is commonly used as glioblastoma model, on the other hand, late passage (LPC6) has been used as astrocyte model [28]. In the present work, we firstly examined cellular morphology by phase-contrast microscopy and ecto-nucleotidase activities by malachite green method in both C6 cell lines. How it was expected, microscopy analysis showed that EPC6 appears smaller and thinner than LPC6, (Figure 1A). In addition the ATPase and ADPase activities were extremely low for both lineages, as we previously reported (Wink *et al.,* 2003). An important finding is the significant difference in AMP hydrolysis observed when we compare these cells, EPC6 efficiently hydrolyze AMP, whereas LPC6 had a significant decrease in the hydrolysis of this nucleotide, showing AMP hydrolysis 86% lower than EPC6 (Figure 1B).

LPC6 and EPC6 cells show similar NTPDase expression however largely differ on ecto-5'-nucleotidase/CD73 expression

Next, to determine whether ecto-nucleotidases expression is related to the number of passages in culture and could be a characteristic of malignance of the C6 cell line, we examined the protein expression of NTPDase-1, NTPDase-2, NTPDase-3 and Ecto-5'-nucleotidase in both EPC6 and LPC6 cells. NTPDase-1, NTPDase-2, NTPDase-3 were poorly expressed in both cell lines, meanwhile e5NT/CD73 is largely expressed in EPC6 than LPC6 cells (Figure 2).

ADO production might be a key to proliferative stimulus

First, to determinate the e5NT/CD73 role on glioma cells proliferation, EPC6 and LPC6 were seeded and allowed to grow for 2, 5 and 10 days before Ki67 expression determination. LPC6 present higher Ki67 expression after growth for 2 days. However, after 5 and 10 days, Ki67 expression was similar to EPC6 and LPC6 (Figure 3A). Considering our hypothesis that e5NT/CD73 is involved in the proliferative behavior of glioma cells, these results suggest that e5NT/CD73 expression *per se* is not enough to provide greater proliferation capability. As e5NT/CD73 is the main extracellular source of adenosine, we decided to investigate the effect of treatment with AMP (the substrate of this enzyme) in EPC6 and LPC6 proliferation. Cells were exposed to 50 µM of AMP for 24, 48 and 72 hours. The cells count showed that the EPC6 had a proliferation rate increased in all times tested when were exposed to AMP (Figure 3B). On the other hand, exogenous AMP had no effect on LPC6 proliferation in any time-point tested (Figure 3C). Therefore, CD73 is an important step for glioblastoma proliferation *in vitro* due to extracellular ADO formation.

Assessment of *in vitro* malignancy parameters

To better characterize the role of e5NT/CD73 in glioma cells, we analyzed the behavior of LPC6 and EPC6 for different parameters of malignancy. It has been reported that e5NT/CD73 has an important cell-cell and cell-extracellular matrix interaction being related to cell migration and adhesion processes in glioma cells [12]. To explore these characteristics, adhesion and migration experiments were performed with EPC6 and LPC6. The results show that EPC6 cells exhibit a significant reduction in adhesion compared to LPC6 in all time-point tested (Figure

4A). Considering that cell adhesion is an essential step for cell migration and motility, a 2D migration (Scratch-Wound healing experiment) and 3D-transwell migration assays were performed with EPC6 and LPC6. As expected, EPC6 cells that have higher e5NT/CD73 expression has greater migratory capacity, showing a 90.9% migrations capacity in Scratch-Wound and 91.0% in transwell assay in 24h of analysis. Otherwise, LPC6, that presents a low expression of e5NT/CD73, only 55.4% of cells were able to migrate in Scratch-Wound experiment and 64.0% in transwell assay in 24h of analysis (Figure 4B and 4C). To investigate whether the enzymatic or non-enzymatic activity of e5NT/CD73 is responsible for this increase, we exposed EPC6 to 100µM or 150µM APCP (the e5NT/CD73 inhibitor). We observed that the cell mobility was reduced by 26.2 % and 54.8% when exposed to APCP 100µM or 150µM, respectively, in the Scratch-Wound healing experiment. In the transwell assay, the reduction was 43% when the cells were exposed to 150µM APCP. In addition, we analyzed the influence of e5NT/CD73 in colony formation. It was found that EPC6 formed more and larger colonies when compared to LPC6. Although both EPC6 and LPC6 have the same proliferative behaviour (Fig 3), EPC6 cells form more colonies and APCP treatment decreased their clonogenic proprieties (Figure 4D). Taken together, our results indicated that e5NT/CD73 is an important step for gliomas malignancy *in vitro* and a high expression of e5NT/CD73 promote invasiveness via its enzymatic activity.

CD73 expression and tumor size – in vivo model

For further investigation of e5NT/CD73 role on glioma progression, we performed an *in vivo* glioma model previously established in our research group [28]. EPC6 and LPC6 cells were implanted in the brain of 60 days-old rats and tumors

were allowed to grow for 20 days. As previously showed the EPC6 tumors presented all histopathological features of GBM, such as nuclear atypia, mitotic activity, intratumoral hemorrhage, foci of tumor necrosis and parenchymal invasion [29]. In some cases, areas of peripheric pseudopalisading delineating the foci of necrosis and lymphocytic infiltration were observed, with occasional formation of edema fluid and neovascularization (Figure 5A). In contrast, rats implanted with LPC6 presented tumor mass reduced, less invasiveness and scant characteristics of glioblastoma (5B). In addition, results from e5NT/CD73 activity were directly correlated with tumor size *in vivo* (Figure 5C).

Discussion

EPC6 lineage has been widely used as a model to investigate several aspects of cell biology of gliomas [30]. However, depending on the number of passages in culture, this lineage presents variations in their morphological (Fig. 1) and biochemical characteristics [31]. In this context, we compare this cell line in two conditions: with no more than 25 passages, named early passages (EPC6) or over 70 passages named late passages (LPC6). Although C6 cells have been widely used as a glioblastoma model for both *in vitro* and *in vivo* studies [32,33], it was observed that LPC6 have some biochemical and physiological characteristics that resemble differentiated astroglial cells [34]. A large number of evidence show that purinergic signaling, in especial e5NT/CD73, is involved in processes associated with glioblastoma grow in vitro and in vivo in a rat model of GBM [35]. Many of these studies used EPC6 to demonstrate the connection between e5NT/CD73 and glioma development, however, to date there are no reports in literature evaluating structural and functional properties of e5NT/CD73 in LPC6. The present study was undertaken

to compare the e5NT/CD73 on different parameters of glioma malignancy on EPC6 and LPC6.

Wink *et al*. described in 2003 [19], a striking difference in the rate of extracellular nucleotide metabolism between glioma cell lines and astrocyte cultures. It was demonstrated that astrocytes quickly hydrolyze extracellular ATP and ADP and presented low e5NT/CD73 activity, on the other hand, all glioma cell line examined presented low rates of ATP and ADP hydrolysis, however presented great e5NT/CD73 activity. Considering this, we first examined the ecto-nucleotidase activities in EPC6 and LPC6. We found that both LPC6 and EPC6, presented low rates of ATP and ADP hydrolysis, meanwhile it was observed lower e5NT/CD73 activity in LPC6 than EPC6. Previous studies have showed that the major ecto-nucleotidase expressed by rat astrocytes in culture is the NTPDase2 [36], contradictorily, our results demonstrated a low expression of all NTPDases in LPC6. Therefore, we can suggest that LPC6 is not a good astrocyte model to study diseases involving purinergic signaling. Moreover, it is important to note a great difference on e5NT/CD73 expression between these two cell lines. In this regard, our group has previously shown that e5NT/CD73 expression increase during proliferative process in glioma cell lines [37] and contribute to cell proliferation and the extracellular ADO produced plays an important role in tumor growth, metastasis [38], angiogenesis [39], chemoresistance [40], and immunosuppression [41]. Our results show that LPC6 and EPC6 have the same proliferation capability in culture. Therefore, e5NT/CD73 *per se* cannot be considered a proliferative factor when we compare LPC6 and EPC6, however, e5NT/CD73 activity and consequent ADO production was able to improve proliferation in EPC6, showing that the presence of e5NT/CD73 and consequent adenosine formation are fundamental for glioma growth.

The production of adenosine may be one explanation for the importance of e5NT/CD73 in glioma tumor growth. A large piece of evidence found in literature demonstrated that e5NT/CD73 plays an important role in the control of glioma cell migration and invasion through an adenosinergic pathway [42]. In this context, e5NT/CD73 downregulation decreased cell migration and invasion, while ADO supplementation reversed these effects [43]. Furthermore, knockdown of e5NT/CD73 inhibits adhesion to extracellular matrix and cell migration in human breast cancer cells [44]. In addition, the e5NT/CD73 has recently proposed as a target for anticancer therapy, because inhibition of this enzyme using either monoclonal antibodies (mAb) or small inhibitors, affecting tumor progression by inhibiting the e5NT/CD73-mediated production of adenosine and decreased metastasis [45]. Recent studies have shown that an anti- e5NT/CD73 mAb inhibits metastasis formation in human breast cancer by cell-surface clustering of e5NT/CD73 followed by its internalization, thus inhibiting the ability to circulate tumor cells to extravasate and colonize, leading to inhibition of metastasis by a mechanism independent of e5NT/CD73 catalytic activity [46]. In our *in vitro* results we found that the e5NT/CD73 expression on EPC6 promoted less adhesion and affected positively the cell migration and this effect was reverted by blocking of e5NT/CD73 enzyme activity. On the other hand, LPC6 presented higher adhesion and consequently a reduced migration. These data reinforce the important role of e5NT/CD73 in glioma cells migration, in this case, dependent in part of its enzyme activity. Adhesion and migration play a very critical role in tumor dissemination, both positive and negative regulation of cell adhesion are required in the tumor invasiveness. Along this line, several authors have originally found that tumor cells are more easily separated from solid tumors than normal cells are from corresponding tissues [47].

Clonogenic assays measure the ability of cells to retain their reproductive integrity over a prolonged period. This is an important feature as it reveals phenotypic effects that require time and possibly several cell divisions to develop [48]. In the clonogenic experiments, we used 10 days as endpoint. The proliferation of LPC6 and EPC6 measured by Ki67 staining, after this time, indicated no difference in proliferation capacity, however, EPC6 was able to form more and bigger colonies when compared to LPC6 and clonogenic capacity of EPC6 was reduced by more than 30% when the enzyme inhibitor APCP was added. Shahar et al. (2017) have shown that both e5NT/CD73 knockdown and suppression of the e5NT/CD73 enzymatic activity with APCP reduced the protein expression of the EMT regulator SNAIL1 and significantly decreased invasiveness and clonogenicity in gliomas stem-like cell. This suggests that there is a reciprocal interaction between EMT-like processes and e5NT/CD73 enzymatic activity [49]. In this context, our results lead us to suggest the possibility that the difference in malignances parameters between EPC6 and LPC6 is the extracellular environment created by e5NT/CD73 that critically determine the interaction between cell-cell and cell-components and which could determine whether the cell will adhere, migrate or completely detach. Finally, in the present work, we analyzed the glioblastoma development by using a well-established GBM tumor model [32, 33]. This *in vivo* data, not involving immunodeficient animals, support the notion of the importance of e5NT/CD73 in GBM invasiveness. While rats implanted with LPC6 developed smaller tumors with defined edges and less invasive characteristics, EPC6 cells developed a tumor of size and histopathological features of highly malignant GBM tumors, confirming the correlation of tumor growth and e5NT/CD73 activity. This is consistent with previous studies that have shown the e5NT/CD73 silencing or enzyme inhibition decreased *in vitro* and *in vivo* glioblastoma

growth [43]. Moreover, e5NT/CD73 knowdown and consequent reduction of extracellular adenosine levels revert the immunosuppressive microenvironment, which permits T cell mediated antitumor responses [50].

Another important point to discuss is the use of the rat brain tumors model by using C6 glioma cells. This model has been widely used in experimental neuro-oncology to evaluate the development of novel therapeutic, diagnostic modalities and tumor development. Our results demonstrate that the measured of e5NT/CD73 activity by the hydrolysis of AMP, is a fast and affordable way to evaluate the age of C6 cells in culture. This previous evaluation might be a necessary step to ensure a characteristic of GBM tumor when using the animal model. Considered this and considered all our e5NT/CD73 activity data (data not shown), we proposed 60 nmol Pi/min/mg protein as minimal activity for EPC6 to stablish a characteristic GBM tumor to these cells.

Taken together, these results obtained by in vitro and in vivo analysis corroborate the idea that alterations in e5NT/CD73 expression and enzymatic activity may represent an important mechanism associated with malignant transformation of glioblastoma and suggest that the increased expression of e5NT/CD73 in malignant cells can be one of the reasons why glioblastomas are so invasive from early in the disease course.

Acknowledgments: This study was supported by the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Compliance with ethical standards: All of the procedures used in the present study followed the “Principles of Laboratory Animal Care” from the National Institutes of Health (NIH) and were approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Figure 1

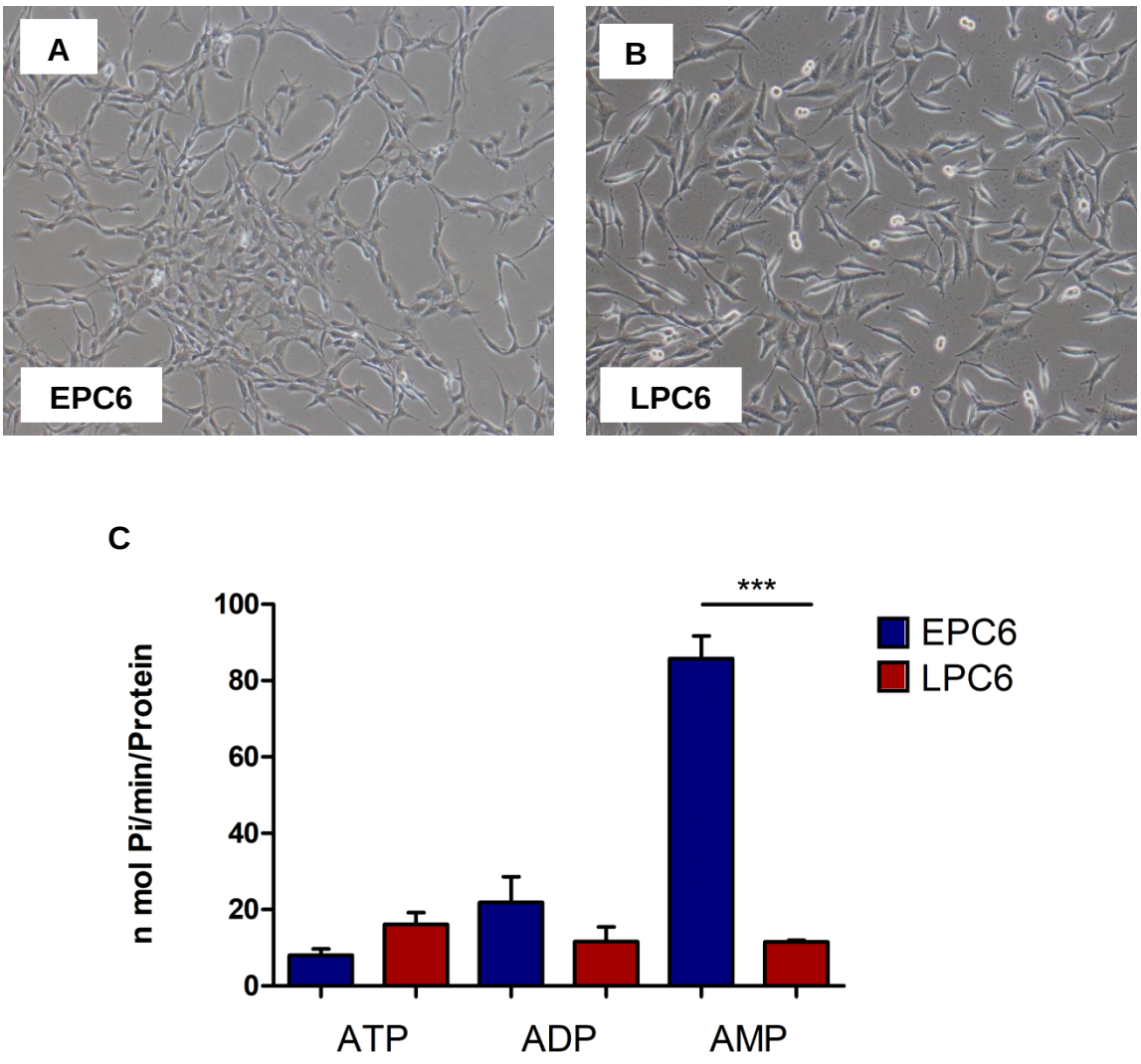


Figure 1: Morphological Differences Between (a) EPC6 and (b) LPC6. EPC6 appeared smaller and thinner than LPC6 cells. (c) ATPase, ADPase and AMPase activity of EPC6 and LPC6. Cells at confluence were incubated with ATP/ADP 1mM and AMP 2mM for 30 and 10 min as described in Material and methods. Specific activity values are expressed as nmol Pi/min/mg protein. Values represent means ± SD from three independent experiments. The values represent the mean ± SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by Student test, significant for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 2

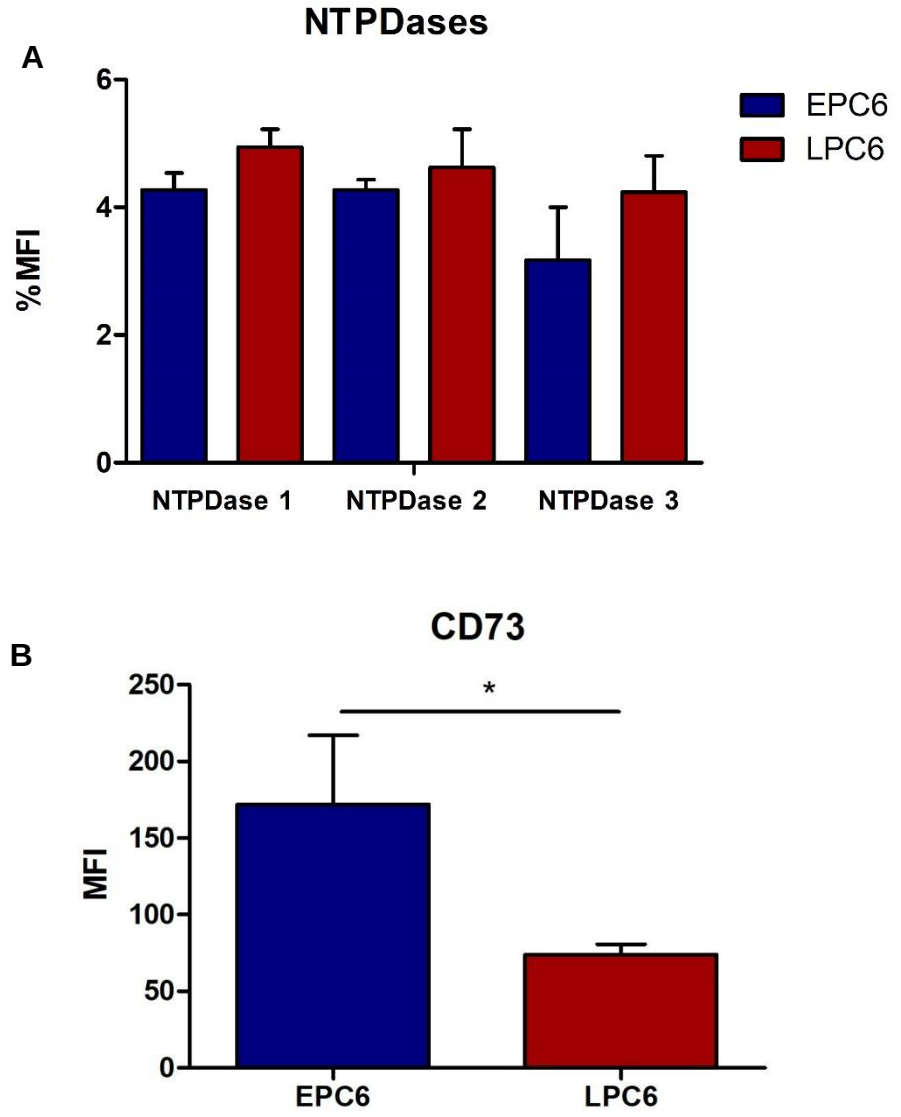


Figure 2: Analysis of ecto-nuclotidase expression by flow citometry in EPC6 and LPC6. NTPDase1, 2 and 3 were poorly expressed in EPC6 and LPC6. The e5NT/CD73 expression was significantly higher in EPC6. The values represent the mean ± SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by Student test, significant for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 3

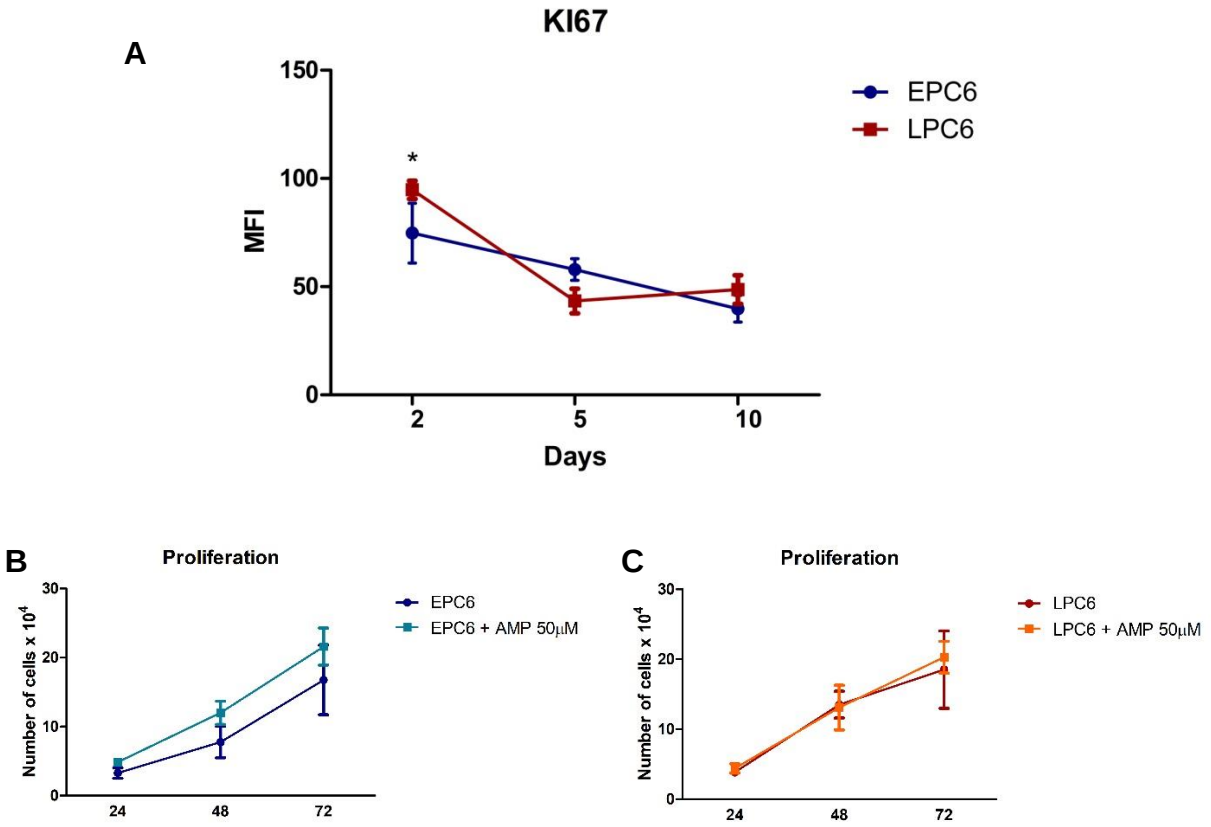
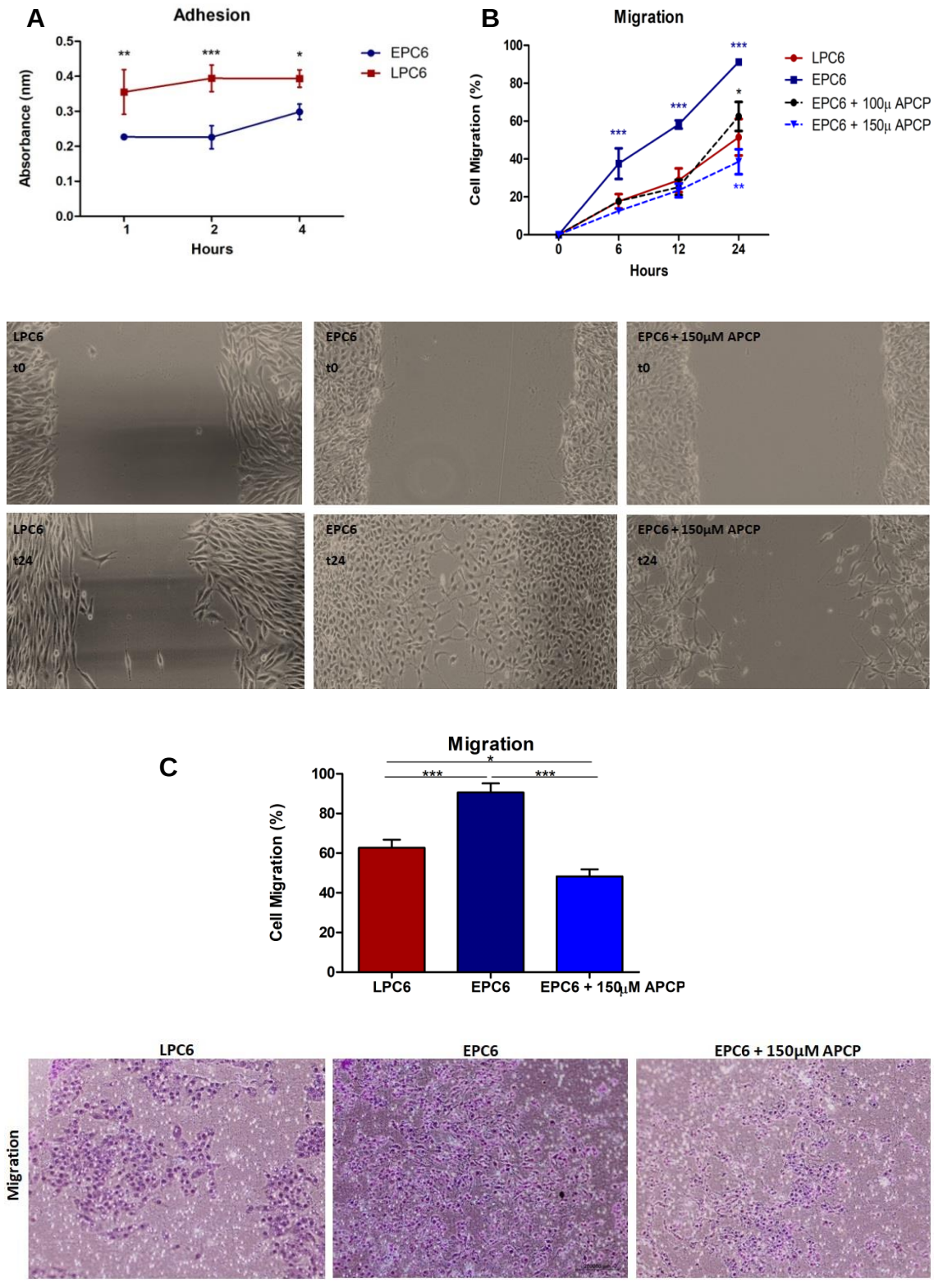


Figure 3: Ki67 expression was measured in LPC6 and EPC6 by flow citometry after 2, 5 and 10 days. The data show LPC6 in a proliferative advantage in 2 days of evaluation, after that the Ki67 expression was almost identical in EPC6 and LPC6 (A). Cell proliferation was assessed by cell counting. EPC6 demonstrated proliferation increase in all times testing even when were exposed to AMP 50 µM (B) and LPC6 was not change proliferation capability (C). The values represent the mean ± SD f at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by Student test, significant for * $p < 0.05$.

Figure 4


A
Adhesion
Absorbance (nm)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
***
*
1
2
4
Hours
EPC6
LPC6
B
Migration
Cell Migration (%)
100
80
60
40
20
0
***
***
*
**
0
6
12
24
Hours
LPC6
EPC6
EPC6 + 100µ APCP
EPC6 + 150µ APCP
LPC6
t0
EPC6
t0
EPC6 + 150µM APCP
t0
LPC6
t24
EPC6
t24
EPC6 + 150µM APCP
t24
C
Migration
Cell Migration (%)
100
80
60
40
20
0
*
***
***
LPC6
EPC6
EPC6 + 150µM APCP
Migration
LPC6
EPC6
EPC6 + 150µM APCP

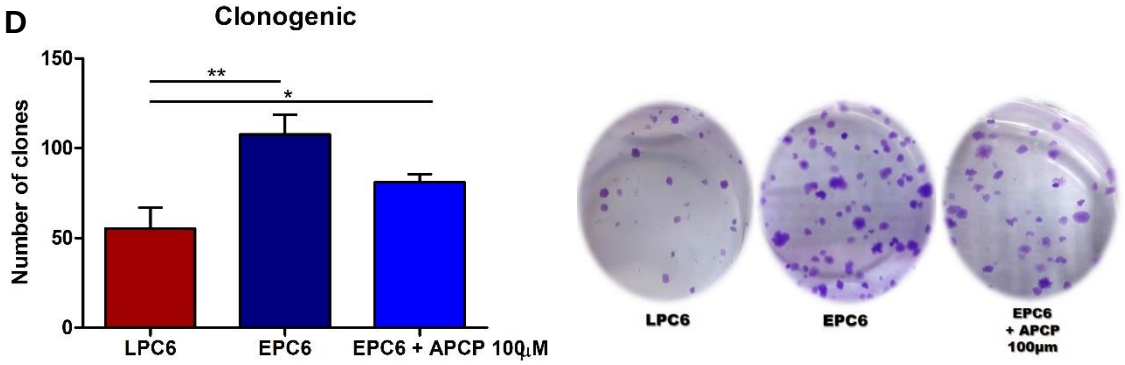


Figure 4: The reduced expression of e5NT/CD73 in LPC6 reduced all malignancy parameters compared to EPC6. Adhesion was performed in increasing times (A). Scratch-Wound assay (B) was performed in LPC6 and EPC6 exposed or not to APCP 100µM or 150µM. The average of initial wound width was measured and defined as 0% of cell migration. Images were collected at increasing times following scratch-wound, as indicated, using an inverted microscope. The migratory Transwell assay (C) LPC6 and EPC6 cells were seeded in DMEM in the upper chamber of transwell. DMEM 10% was added to the lower chamber and the images were collected after 24h of incubation. The images correspond to the lower face of the chamber. Colony formation was analyzed by clonogenic assay in LPC6 and EPC6 exposed or not to APCP 100µM (D). The values represent the mean ± SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by Student test, significant for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ for Adhesion assay and analyzed by ANOVA followed by Tukey's test, significant for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ for the other experiments.

Figure 5

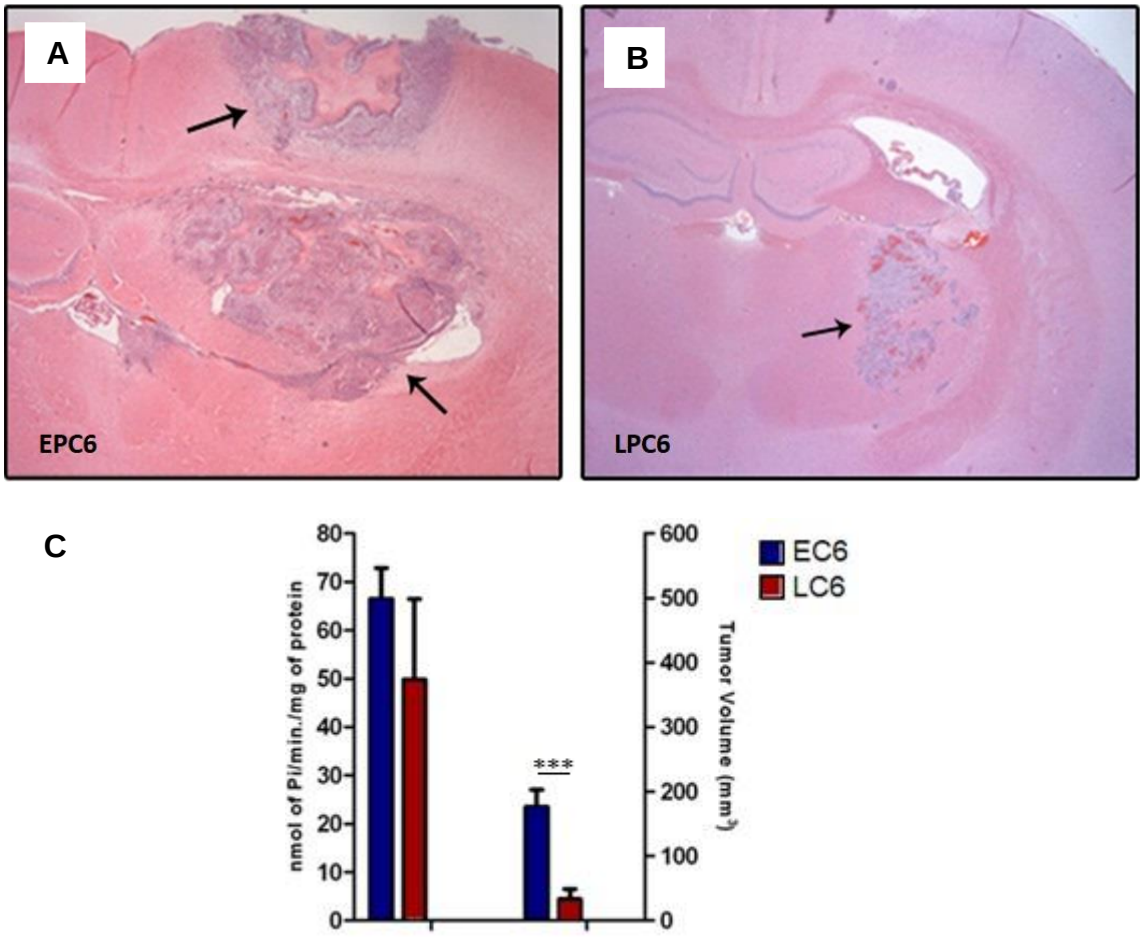


Figure 5: EPC6 and LPC6 were implanted in the rat brain and the tumor size were evaluated by haematoxylin and eosin (H&E) standard staining as described in Material and Methods. Black arrows show the localization of tumor mass. Magnification of 20 X (A) EPC6 and (B) LPC6. Graph shows the correlation of CD73 activity and the tumor size *in vivo* (C). e5NT/CD73 activity was assayed by malachite green method as described in Material and Methods. Data are means ± SD of at least 4 animals per group or three independent experiments carried out in triplicates.

References

1- Vigneswaran, K., Neill, S., & Hadjipanayis, C. G. (2015). Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. Annals of translational medicine, 3(7), 95. https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.57

2- Konopka, G., & Bonni, A. (2003). Signaling pathways regulating gliomagenesis. Current molecular medicine, 3(1), 73–84. https://doi.org/10.2174/1566524033361609

3- Sathornsumetee, S., Reardon, D. A., Desjardins, A., Quinn, J. A., Vredenburgh, J. J., & Rich, J. N. (2007). Molecularly targeted therapy for malignant glioma. Cancer, 110(1), 13–24. https://doi.org/10.1002/cncr.22741

4- Burnstock G. (2009). Purinergic signalling: past, present and future. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas, 42(1), 3–8. https://doi.org/10.1590/s0100-879x2008005000037

5- Robson, S. C., Sévigny, J., & Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic signalling, 2(2), 409–430. https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5

6- Wang, L., Zhou, X., Zhou, T., Ma, D., Chen, S., Zhi, X., Yin, L., Shao, Z., Ou, Z., & Zhou, P. (2008). Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. Journal of cancer research and clinical oncology, 134(3), 365–372. https://doi.org/10.1007/s00432-007-0292-z

7- Zimmermann H. (1992). 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. The Biochemical journal, 285 (Pt 2)(Pt 2), 345–365. https://doi.org/10.1042/bj2850345

8- Stochaj, U., Dieckhoff, J., Mollenhauer, J., Cramer, M., & Mannherz, H. G. (1989). Evidence for the direct interaction of chicken gizzard 5'-nucleotidase with laminin and fibronectin. Biochimica et biophysica acta, 992(3), 385–392. https://doi.org/10.1016/0304-4165(89)90101-3

9- Vijayan, D., Young, A., Teng, M., & Smyth, M. J. (2017). Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. Nature reviews. Cancer, v.17(12), p.709–724. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.86

10-Wang, R., Zhang, Y., Lin, X., Gao, Y., & Zhu, Y. (2017). Prognositic value of CD73-adenosinergic pathway in solid tumor: A meta-analysis and

systematic review. Oncotarget, 8(34), 57327–57336. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16905

11- Gao, Z. W., Wang, H. P., Lin, F., Wang, X., Long, M., Zhang, H. Z., & Dong, K. (2017). CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. BMC cancer, 17(1), 135. https://doi.org/10.1186/s12885-017-3128-5

12- Zhou, P., Zhi, X., Zhou, T., Chen, S., Li, X., Wang, L., Yin, L., Shao, Z., & Ou, Z. (2007). Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. Cancer biology & therapy, 6(3), 426–431. https://doi.org/10.4161/cbt.6.3.3762

13- Lupia, M., Angiolini, F., Bertalot, G., Freddi, S., Sachsenmeier, K. F., Chisci, E., Kutryb-Zajac, B., Confalonieri, S., Smolenski, R. T., Giovannoni, R., Colombo, N., Bianchi, F., & Cavallaro, U. (2018). CD73 Regulates Stemness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer-Initiating Cells. Stem cell reports, 10(4), 1412–1425. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.02.009

14- Stagg, J., Divisekera, U., Duret, H., Sparwasser, T., Teng, M. W., Darcy, P. K., & Smyth, M. J. (2011). CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. Cancer research, 71(8), 2892–2900. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4246

15- Wang, H., Lee, S., Nigro, C. L., Lattanzio, L., Merlano, M., Monteverde, M., Matin, R., Purdie, K., Mladkova, N., Bergamaschi, D., Harwood, C., Syed, N., Szlosarek, P., Briasoulis, E., McHugh, A., Thompson, A., Evans, A., Leigh, I., Fleming, C., Inman, G. J., … Crook, T. (2012). NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. British journal of cancer, 106(8), 1446–1452. https://doi.org/10.1038/bjc.2012.95

16- Cunha. M.L.V., e Maldaun. M.V.C (2019) Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. Revista da Associação Médica Brasileira, vol.65, p.424-433 http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.65.3.424

17- Beauchesne P. (2011). Extra-neural metastases of malignant gliomas: myth or reality?. Cancers, 3(1), 461–477. https://doi.org/10.3390/cancers3010461

18- Bavaresco, L., Bernardi, A., Braganhol, E., Cappellari, A. R., Rockenbach, L., Farias, P. F., Wink, M. R., Delgado-Cañedo, A., & Battastini, A. M. (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. Molecular and cellular biochemistry, 319(1-2), 61–68. https://doi.org/10.1007/s11010-008-9877-3

19- Wink, M. R., Lenz, G., Braganhol, E., Tamajusuku, A. S., Schwartsmann, G., Sarkis, J. J., & Battastini, A. M. (2003). Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. Cancer letters, 198(2), 211–218. https://doi.org/10.1016/s0304-3835(03)00308-2

20- Wink, M. R., Braganhol, E., Tamajusuku, A. S., Casali, E. A., Karl, J., Barreto-Chaves, M. L., Sarkis, J. J., & Battastini, A. M. (2003). Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. Neurochemistry international, 43(7), 621–628. https://doi.org/10.1016/s0197-0186(03)00094-9

21- Morrone, F. B., Jacques-Silva, M. C., Horn, A. P., Bernardi, A., Schwartsmann, G., Rodnight, R., & Lenz, G. (2003). Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. Journal of neuro-oncology, 64(3), 211–218. https://doi.org/10.1023/a:1025699932270

22- Goya, L., Feng, P. T., Aliabadi, S., & Timiras, P. S. (1996). Effect of growth factors on the in vitro growth and differentiation of early and late passage C6 glioma cells. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience, 14(4), 409–417.

23- Sokolowska, P., & Nowak, J. Z. (2006). Cyclic AMP formation in C6 glioma cells: effect of PACAP and VIP in early and late passages. Annals of the New York Academy of Sciences, 1070, 566–569. https://doi.org/10.1196/annals.1317.082

24- Chan KM, Delfert D, Junger KD. (1968) A direct colorimetric assay for Ca^{2+}-stimulated ATPase activity. Anal Biochem; v.157, p.375-380.

25- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem; v. 72, p.248-254.

26- Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M. Cell migration and invasion assays. Methods 2005, 37(2):208-15.

27- Mallorga, P., Tallman, J. F., & Fishman, P. H. (1981). Differences in the beta-adrenergic responsiveness between high and low passage rat glioma C6 cells. Biochimica et biophysica acta, 678(2), 221–229. https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90210-5

28- Quincozes-Santos, A., Rosa, R. B., Leipnitz, G., de Souza, D. F., Seminotti, B., Wajner, M., & Gonçalves, C. A. (2010). Induction of S100B secretion in C6 astroglial cells by the major metabolites accumulating in glutaric acidemia type I. Metabolic brain disease, 25(2), 191–198. https://doi.org/10.1007/s11011-010-9203-0

29- Morrone, F. B., Oliveira, D. L., Gamermann, P., Stella, J., Wofchuk, S., Wink, M. R., Meurer, L., Edelweiss, M. I., Lenz, G., & Battastini, A. M. (2006). In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. BMC cancer, 6, 226. https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-226

30- Barth, R. F., & Kaur, B. (2009). Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. Journal of neuro-oncology, 94(3), 299–312. https://doi.org/10.1007/s11060-009-9875-7

31- Lee, K., Kentroti, S., Billie, H., Bruce, C., & Vernadakis, A. (1992). Comparative biochemical, morphological, and immunocytochemical studies between C-6 glial cells of early and late passages and advanced passages of glial cells derived from aged mouse cerebral hemispheres. Glia, 6(4), 245–257. https://doi.org/10.1002/glia.440060402

32- Scholl, J. N., de Fraga Dias, A., Pizzato, P. R., Lopes, D. V., Moritz, C., Jandrey, E., Souto, G. D., Colombo, M., Rohden, F., Sévigny, J., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Battastini, A., & Figueiró, F. (2020). Characterization and antiproliferative activity of glioma-derived extracellular vesicles. Nanomedicine (London, England), 15(10), 1001–1018. https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0431

33- Figueiro, F., De Oliveira, C. P., Rockenbach, L., Mendes, F. B., Bergamin, L. S., Jandrey, E. H. F., … Battastini, A. M. O. (2015). Pharmacological improvement and preclinical evaluation of methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules in a glioblastoma model. Journal of Biomedical Nanotechnology, 11(10), 1808–1818. https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2125

34- Kazazoglou, T., Fleischer-Lambropoulos, E., Geladopoulos, T., Kentroti, S., Stefanis, C., & Vernadakis, A. (1996). Differential responsiveness of late passage C-6 glial cells and advanced passages of astrocytes derived from aged mouse cerebral hemispheres to cytokines and growth factors: glutamine synthetase activity. Neurochemical research, 21(5), 609–614. https://doi.org/10.1007/BF02527760

35- Zhang B. (2012). CD73 promotes tumor growth and metastasis. Oncoimmunology, 1(1), 67–70. https://doi.org/10.4161/onci.1.1.18068

36- Wink, M. R., Braganhol, E., Tamajusuku, A. S., Lenz, G., Zerbini, L. F., Libermann, T. A., Sévigny, J., Battastini, A. M., & Robson, S. C. (2006). Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. Neuroscience, 138(2), 421–432. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.039

37- Bavaresco, L., Bernardi, A., Braganhol, E., Cappellari, A. R., Rockenbach, L., Farias, P. F., Wink, M. R., Delgado-Cañedo, A., & Battastini, A. M. (2008). The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. Molecular and cellular biochemistry, 319(1-2), 61–68. https://doi.org/10.1007/s11010-008-9877-3

38- Pietrobono, D., Giacomelli, C., Marchetti, L., Martini, C., & Trincavelli, M. L. (2020). High Adenosine Extracellular Levels Induce Glioblastoma Aggressive Traits Modulating the Mesenchymal Stromal Cell Secretome. International journal of molecular sciences, 21(20), 7706. https://doi.org/10.3390/ijms21207706

39- Allard, B., Turcotte, M., Spring, K., Pommey, S., Royal, I., & Stagg, J. (2014). Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. International journal of cancer, 134(6), 1466–1473. https://doi.org/10.1002/ijc.28456

40- Quezada, C., Garrido, W., Oyarzún, C., Fernández, K., Segura, R., Melo, R., Casanello, P., Sobrevia, L., & San Martín, R. (2013). 5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. Journal of cellular physiology, v.228(3), p.602–608. https://doi.org/10.1002/jcp.24168

41- Roh, M., Wainwright, D. A., Wu, J. D., Wan, Y., & Zhang, B. (2020). Targeting CD73 to augment cancer immunotherapy. Current opinion in pharmacology, 53, 66–76. https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.07.001

42- Yegutkin, G. G., Marttila-Ichihara, F., Karikoski, M., Niemelä, J., Laurila, J. P., Elima, K., Jalkanen, S., & Salmi, M. (2011). Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. European journal of immunology, 41(5), 1231–1241. https://doi.org/10.1002/eji.201041292

43- Azambuja, J. H., Gelsleichter, N. E., Beckenkamp, L. R., Iser, I. C., Fernandes, M. C., Figueiró, F., Battastini, A., Scholl, J. N., de Oliveira, F. H., Spanevello, R. M., Sévigny, J., Wink, M. R., Stefani, M. A., Teixeira, H. F., & Braganhol, E. (2019). CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. Molecular neurobiology, 56(5), 3260–3279. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1240-4

44- Wang, L., Zhou, X., Zhou, T., Ma, D., Chen, S., Zhi, X., Yin, L., Shao, Z., Ou, Z., & Zhou, P. (2008). Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. Journal of cancer research and clinical oncology, 134(3), 365–372. https://doi.org/10.1007/s00432-007-0292-z

45- Stagg, J., Divisekera, U., McLaughlin, N., Sharkey, J., Pommey, S., Denoyer, D., Dwyer, K. M., & Smyth, M. J. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(4), 1547–1552. https://doi.org/10.1073/pnas.0908801107

46- Terp, M. G., Olesen, K. A., Arnspang, E. C., Lund, R. R., Lagerholm, B. C., Ditzel, H. J., & Leth-Larsen, R. (2013). Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 191(8), 4165–4173. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301274

47- Geiger, B., Spatz, J. P., & Bershadsky, A. D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. Nature reviews. Molecular cell biology, 10(1), 21–33. https://doi.org/10.1038/nrm2593

48- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. Nature protocols, 1(5), 2315–2319. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339

49- Tsiampali, J., Neumann, S., Giesen, B., Koch, K., Maciaczyk, D., Janiak, C., Hänggi, D., & Maciaczyk, J. (2020). Enzymatic Activity of CD73 Modulates Invasion of Gliomas via Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Reprogramming. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 13(11), 378. https://doi.org/10.3390/ph13110378

50- Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., & Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. Immunological reviews, 276(1), 121–144. https://doi.org/10.1111/imr.12528

CAPÍTULO II

Aqui serão abordados e apresentados os resultados da dissertação obtidos até a interrupção das atividades devido a pandemia de Sars-cov-2 que iniciou em março de 2020 no Brasil.

Título: Avaliação do envolvimento da ecto-5'-nucleotidase/CD73 na resistência de linhagens de glioma humano ao tratamento com Temozolamida em avaliações crônicas e agudas.

Autores: Fabiana M. Manica[1], Juliete N. Scholl[1], Luiz F. L. Silva[1], Fabrício Figueiró[1,2] e Ana M. O. Battastini[1].

Afiliações: [1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. [2]Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Introdução

GBM é o tumor glial com maior incidência em adultos e idosos; é também um dos tumores de maior malignidade com uma sobrevida mediana de aproximadamente 14 a 18 meses (Ostrom *et al.,* 2015). Sua alta letalidade pode estar relacionada com algumas de suas características mais comuns tais como anaplasia celular, alto índice proliferativo, extensa área de necrose, infiltração do parênquima cerebral, grande resistência às terapias e consequente recorrência (Cheng *et al.,* 2011). O tratamento padrão para GBM, se baseia na utilização de temozolamida (TMZ) em uma dose inicial de 75 mg/m^2/dia por seis semanas, de forma concomitante com a radioterapia. Em seguida, são administradas doses de 150 - 200mg/m^2 por cinco dias em intervalos de 28 dias durante 6 ciclos (Omay e Vogelbaum *et al.,* 2009). Um dos principais desafios no tratamento de pacientes com GBM consiste na dificuldade de remoção do tumor, por se tratar de um tecido extremamente nobre e o fato de ser um tumor intensamente infiltrado, a remoção completa se torna praticamente impossível (McGirt *et al.,* 2009). Outro ponto importante é a resistência aos tratamentos e à ineficiência na prevenção da reincidência, por essa razão o manejo dos pacientes com GBM, mesmo com todos os avanços da ciência, permanece essencialmente paliativo (Stupp *el al.,* 2005).

Um dos principais mecanismos de resistência à TMZ descritos para o glioblastoma é a alta expressão de MGMT (enzima envolvida no reparo do dano ao DNA causado por TMZ), entretanto, apesar da avaliação da metilação no gene promotor da MGMT ser um importante fator prognóstico para a resposta dos pacientes à TMZ, estudos demonstraram que a inibição direta de MGMT não aumentou significativamente a sobrevida de pacientes com GBM recorrente tratados com TMZ (Yu *et al.,* 2020). Neste contexto, se faz necessário avanços na

compreensão dos mecanismos associados a essa natureza extremamente agressiva do GBM, para então diminuir a resistência a drogas, promover um avanço na resposta terapêutica e melhorar a qualidade de vida do paciente.

Neste cenário, outra característica relevante para ser avaliada no GBM é a vasta expressão da enzima e5NT/CD73, que hidrolisa o AMP até adenosina, nas superfícies celulares. A adenosina formada pela e5NT/CD73 desempenha um importante papel no imuno-escape tumoral, na angiogênese e na resistência tumoral (Gao *et al.,* 2014). Essa sinalização pode ocorrer por meio de 4 receptores acoplados à proteínas G; A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3. Diferindo entre si pela concentração de adenosina necessária para ativar cada receptor, sendo A_1 e A_{2A}, de alta afinidade, ativados em concentrações basais (Kd 70 e 150 nM respectivamente) e A_{2B} e A_3 ativados apenas em altas concentrações de adenosina, geralmente patológicas (Kd 5100 e 6500 nM respectivamente) (Jacobson *et al.,* 2006). Diversos estudos recentes tem associado a e5NT/CD73 com o desenvolvimento de resistência à drogas antitumorais. Em relação ao carcinoma nasofaríngeo (CNF), foi observado que ao co-cultivar células de CNF com meio condicionado derivado de células tronco mesenquimais (CTM), as células de CNF aumentaram a expressão de e5NT/CD73, e ao tratar essas mesmas células com cisplatina, foi constatado uma maior resistência, demonstrando que as CTM promovem a quimiorresistência em CNF por meio de regulação positiva da e5NT/CD73 (Zeng, Chen e Li 2020). Seguindo por esse pensamento, outro estudo demonstrou que em linhagens carcinoma hepatocelular HepG2 e Hep3B o silenciamento da e5NT/CD73 aumentou a sensibilidade das linhagens aos tratamentos com cisplatina e sorafenibe (Peng, Xue e Ju 2020). Entretanto, em nenhum dos estudos citados, fica claro como a e5NT/CD73 atuaria intensificando a resistência das células, apenas é demonstrada

a relação entre aumento da expressão de e5NT/CD73 e aumento da resistência ou silenciamento da e5NT/CD73 e aumento da sensibilidade.

Alguns estudos têm demonstrado que a resistência aos quimioterápicos envolvendo a e5NT/CD73 ocorre via ativação de receptores de adenosina. Foi demonstrado em um modelo de GBM, que camundongos deficientes de e5NT/CD73 desenvolviam tumores de tamanho reduzido, com menos vasos sanguíneos e menos invasivos e que as células de glioma de camundongo quando tratadas com antagonista do receptor A_{2B} aumentam sua sensibilidade à TMZ e quando tratadas com agonista de A_{2B} tornam-se mais resistentes (Yan et al., 2019). Quezada e colaboradores (2013) foram mais a fundo, demonstrando as vias de sinalização possivelmente envolvidas. Para isso, o grupo de pesquisa promoveu a inibição da e5NT/CD73 utilizando APCP nas células de glioma. Ao promover a inibição da enzima, verificaram uma diminuição da expressão e da atividade de MRP1 (Proteína associada à resistência a multidrogas 1) conhecida pela sua capacidade de extrusão de drogas, o que resultou em aumento de sensibilidade a Vincristina. O mesmo grupo de pesquisa também observou que o receptor A_3 apresentou o maior nível de expressão dentre os quatro receptores de adenosina, e sua inibição produziu uma diminuição da expressão e atividade do MRP1. Levando em consideração esses resultados, fica estabelecida uma possível relação entre a atividade da e5NT/CD73 e o desenvolvimento de resistência aos antitumorais, entretanto, o mecanismo de sinalização envolvendo e5NT/CD73 e aumento de resistência celular permanece incerto, bem como, existem pouquíssimos estudos avaliando a relação da atividade da e5NT/CD73 em células de glioma humano e o tratamento com TMZ.

Com base nas referências supracitadas e sabendo que o glioblastoma é um câncer com alta recorrência, nós decidimos investigar se a modulação farmacológica

da e5NT/CD73 e dos receptores de adenosina poderiam interferir no padrão de resistência de células de glioma humano, utilizando doses clinicamente relevantes de TMZ em avaliações de curto e longo prazo, para nos assemelharmos aos padrões de tratamento utilizados na prática clínica. Sendo nossa premissa verdadeira, posteriormente avaliaríamos os mecanismos celulares envolvidos na resistência envolvendo e5NT/CD73.

Materiais e Métodos

Linhagens celulares e tratamentos

As linhagens de glioma humano U251 e U138 foram obtidas da American TypeCultureCollection (ATCC Rockville MD). Ambas foram mantidas em meio de cultura DMEM, na presença de 0,5 U/mL de penicilina/estreptomicina, 0,1% de fungizona e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em estufa a 37 ˚C com umidade relativa de ar de 95% e atmosfera de 5% CO_2. TMZ e APCP foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). MRS 1220 (9-Chloro-2-(2-furanyl)-5-((phenylacetyl)amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline) antagonista do receptor A_3 e ISAM-140 (4-(2-Furanyl)-4,10-dihydro-2-methylpyrimido[1,2-*a*]benzimidazole-3-carboxylic acid-1-methylethyl ester) antagonista do receptor A_{2B} foram obtidos da Tocris Cookson (UK).

Sensibilidade aguda à TMZ

As células de glioma foram semeadas em placas de 24 poços nas densidades de 8.000 células/poço para a U251 e 7.000 célula/poço para U138 e tratadas com TMZ nas concentrações de 10, 25, 50 e 100µM. Transcorridos 5 dias as células

remanescentes foram contadas em câmara de Neubauer por exclusão de azul de tripan. A sensibilidade aguda foi obtida pela razão entre a quantidade absoluta de células do grupo tratado em relação ao grupo controle. O IC_{50} foi determinado utilizando o programa estatístico Graphpad Prism 5.

Ensaio de atividade da e5NT/CD73

As linhagens U251 e U138 foram semeadas em placas de 24 poços. Quando as células atingiram a semi-confluência, elas foram tratadas com 25, 50 e 100 µM de APCP por 24h. Transcorrido esse tempo as placas foram lavadas três vezes com meio de incubação livre de fosfato e a reação enzimática foi iniciada pela adição de 200 µL de meio de incubação contendo 2 mM de $MgCl_2$ e 2 mM de AMP. Transcorridos 10 minutos de incubação, a reação foi parada com adição de 150 µL TCA 10% a 4,0 ˚C. O fosfato inorgânico liberado (Pi) foi medido através do método de verde malaquita (Chan *et al*., 1986), usando KH_2PO_4 como fosfato inorgânico padrão. Para a dosagem de proteína as células foram solubilizadas com 100 µL de NaOH 1M e congeladas por 24h. Uma alíquota foi retirada para dosagem através do método de “Coomassie blue” (Bradford, 1976), utilizando-se albumina bovina como padrão. A atividade específica da enzima foi expressa em nmolPi/min/mg de proteína.

Modulação de sensibilidade à TMZ

As células de glioma foram semeadas em placas de 24 poços nas densidades de 8.000 células/poço para a U251 e 7.000 célula/poço para U138. Após 24h de semeadura, com a finalidade de modular o sistema purinérgico, as células foram tratadas com 50 µM de AMP por 30 min e após esse tempo foram tratadas com 50µM ou 100µM de APCP ou 1µM de MRS1220 ou 10µM ISAM-140 por 1h,

transcorrido o tempo as células foram tratadas com TMZ nas concentrações de 20µM para U251 e 75µM para U138. Após 5 dias de tratamento as células remanescentes foram contadas em câmara de Neubauer por exclusão de azul de tripan. Para as células U138, após a contagem, as células foram re-semeadas e um novo ciclo de tratamento foi realizado. A sensibilidade à TMZ foi obtida pela razão entre a quantidade absoluta de células de cada grupo tratado em relação ao seu respectivo grupo controle. Para este experimento foram realizados grupos controle contendo AMP, AMP + APCP, AMP + TMZ, AMP + MRS1220 e AMP + ISAM-140. Os referidos grupos controle foram analisados e não apresentaram nenhuma diferença estatística em relação ao grupo controle de células, por esse motivo e para facilitar a visualização dos gráficos esses dados foram suprimidos.

Cumulative Population Doublings (CPD)

Para obter a duplicação da população (PD) as células foram semeadas em placas de 24 poços nas densidades de 8.000 células/poço para a U251 e 7.000 célula/poço para U138. Após 24h de semeadura, as células foram tratadas com 50µM de AMP por 30 min e após esse tempo foram tratadas com 50µM ou 100µM de APCP por 1h, transcorrido o tempo as células foram tratadas com TMZ nas concentrações de 20 µM para U251 e 75 µM para U138. Nos dias 5, 10 e 15 uma amostra das células foi contada utilizando câmara de Neubauer, as células restantes foram semeadas novamente. Os valores iniciais e finais das células em cada intervalo de tempo foram plotados em uma fórmula: PD¼ (ln (FN) - ln (IN)) / ln 2, onde FN (Número Final) corresponde ao número de células no poço no momento da contagem e IN (Número Inicial) é o número de células semeadas na passagem anterior a contagem (Silva *et al.,* 2016). Os valores cumulativos de PD foram

plotados em um gráfico versus dias de cultura. Para este experimento foram realizados grupos controle contendo AMP, AMP + APCP e AMP + TMZ. Os referidos grupos controle foram analisados e não apresentaram nenhuma diferença estatística em relação ao grupo controle de células, por esse motivo e para facilitar a visualização dos gráficos esses dados foram suprimidos.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± DP e analisados por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, usando o *GraphPad Prism Software 5*. As diferenças foram consideradas significativas em relação ao controle veículo quando *$p< 0,05;$ **p<0.01; ***p<0.001.

Resultados

Sensibilidade aguda à Temozolamida - TMZ

A **figura 1** representa a viabilidade celular após 5 dias de tratamento com TMZ em diferentes concentrações. Segundo a literatura, quando a TMZ é administrada em sua dose máxima tolerada (200 mg/m^2) atinge um nível plasmático de 50 – 80 µM (Li et al., 2015). Considerando esses dados e para tentar nos aproximar da realidade clínica, decidimos utilizar TMZ em uma concentração máxima de 100 µM no teste de sensibilidade *in vitro*. Foi possível verificar em nossa curva de dose resposta de 5 dias que a linhagem U251 demonstrou ser bastante sensível à TMZ, com um IC_{50} de 19,5 µM, por outro lado, as células da linhagem U138 demonstraram ser resistentes as concentrações testadas com um IC_{50} maior que 100 µM. Esses dados estão de acordo com os dados descritos por Silva *et al*. (2016).

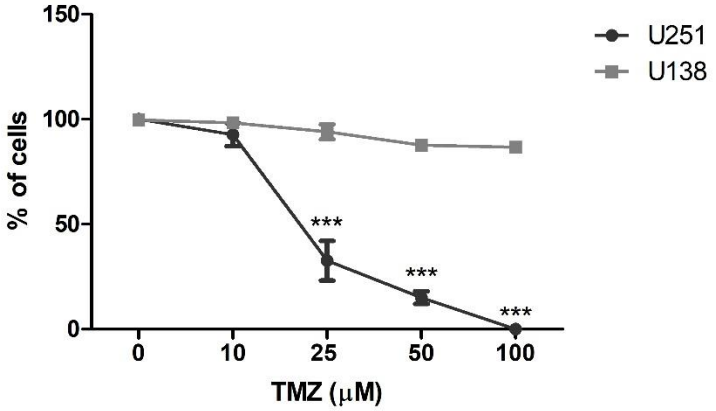


Figura 1: Tratamento das linhagens U251 e U138 com TMZ em uma única administração de 10, 25, 50 ou 100 µM. A porcentagem de células viáveis foi determinada após 5 dias de tratamento por contagem utilizando câmara de Neubauer por exclusão de azul de tripan. Os valores representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes. IC_{50} foi determinado utilizando o programa estatístico Graphpad Prism 5. (*p<0.05; **p<0.01;***p<0.001).

Inibição farmacológica da e5NT/CD73 por APCP

Após os valores de IC_{50} da TMZ estabelecidos para cada linhagem celular, verificamos em quais concentrações de APCP (inibidor específico da e5NT/CD73) as linhagens mantinham baixa atividade da e5NT/CD73 por pelo menos 24h, a fim de estabelecer as concentrações necessárias de APCP para modulação enzimática. Para essa avaliação realizamos o ensaio de liberação de fosfato, como descrito em materiais e métodos. Neste experimento foi possível observar que para a linhagem U251 o valor de 50 µM de APCP foi capaz de diminuir a atividade da e5NT/CD73 por 24 horas **(Figura 2A)**, já para a linhagem U138 o valor de 100 µM de APCP foi capaz de diminuir a atividade da e5NT/CD73 por 24 horas **(Figura 2B).** As concentrações utilizadas para ISAM-140 (antagonista do receptor A_{2B}) e MRS1220 (antagonista do receptor A_3) foram escolhidas a partir de dados extraídos de artigos publicados, com valores de 10 µM para ISAM-140 e 1 µM para MRS1220. Esses valores estabelecidos foram utilizados nos experimentos seguintes.

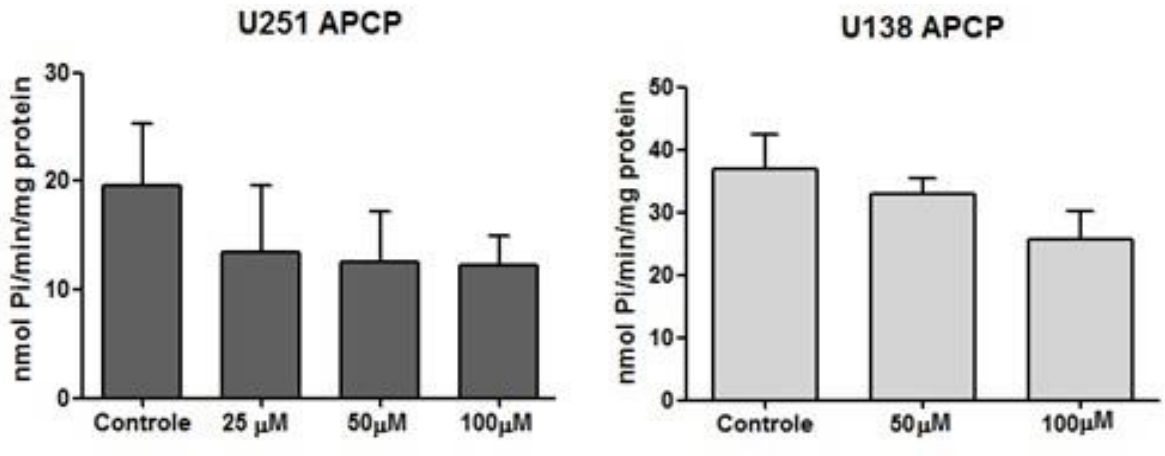


Figura 2: Atividade da CD73 nas linhagens U251 e U138 após tratamento com APCP em uma única administração de 25, 50 ou 100 µM por 24h. A atividade da e5NT/CD73 foi medida pelo método de liberação de Pi, como descrito em materiais e métodos. Os valores representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido por post-hoc de Tukey. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos.

Modulação da atividade da e5NT/CD73 e avaliação de sensibilidade aguda à TMZ

Existem diversos dados na literatura que demonstram a alta resistência do GBM aos tratamentos disponíveis (Haar *et al.,* 2012). Mais recentemente, a literatura tem relacionado a atividade de e5NT/CD73 e a consequente formação de Ado, via receptores de adenosina, com o aumento da resistência celular (Garrido *et al.,* 2014). Tendo em vista esses dados, decidimos avaliar se a inibição farmacológica da e5NT/CD73 seria capaz de alterar a sensibilidade das células frente à TMZ em um modelo de resposta aguda. Tendo em mãos os valores de IC_{50} estabelecidos para cada linhagem e as concentrações de APCP necessárias para diminuir a atividade da e5NT/CD73 por 24h, verificamos se o tratamento com APCP era capaz de modificar o padrão de sensibilidade previamente estabelecido com TMZ. Verificamos que para a linhagem U251 a inibição da e5NT/CD73 não foi capaz de

aumentar a sensibilidade dessas células ao tratamento **(Figura 3)**. O mesmo acontece para a linhagem U138, que após dois ciclos de tratamento com inibição da e5NT/CD73, não altera o padrão de sensibilidade **(Figura 4 A e B)**.

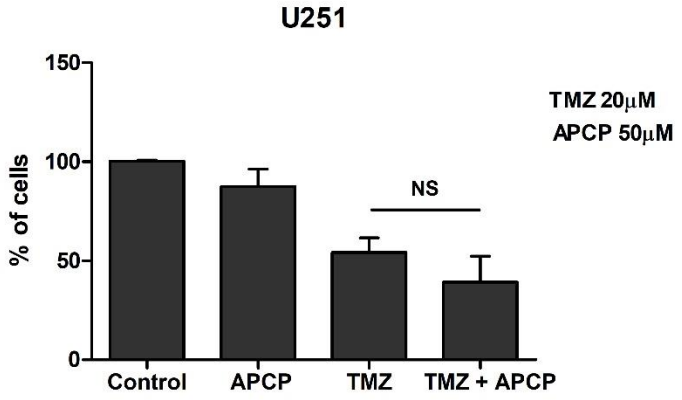


Figura 3: Os gráficos representam a sensibilidade da linhagem U251 frente TMZ com inibição ou não da CD73 em uma avaliação após 5 dias de tratamento, conforme descrito em materiais e métodos. A linhagem U251 não altera sua sensibilidade à TMZ mesmo após inibição da e5NT/CD73. Os valores representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido por post-hoc de Tukey. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos de teste de interesse (TMZ x APCP + TMZ).

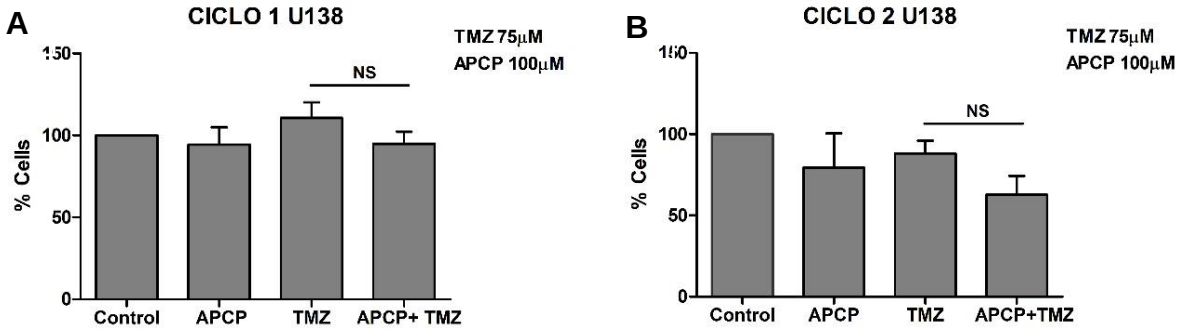
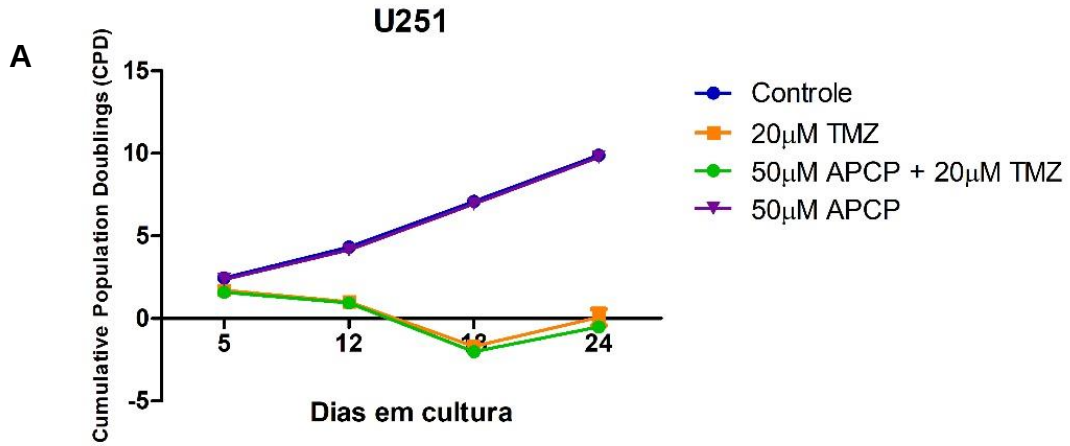


Figura 4: Os gráficos representam a sensibilidade da linhagem U138 frente TMZ com inibição ou não da CD73 em uma avaliação após 5 dias de tratamento, conforme descrito em materiais e métodos. A linhagem U138 não altera sua sensibilidade à TMZ após inibição da CD73 (A). Após um segundo ciclo de tratamento as células parecem mais sensíveis ao tratamento com TMZ, mas a inibição da CD73 não foi capaz de aumentar significativamente essa sensibilidade (B). Os valores representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido por post-hoc de Tukey. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos de teste de interesse (TMZ x APCP + TMZ).

Modulação da atividade da e5NT/CD73 e avaliação de sensibilidade à TMZ em modelo de tratamento crônico

Tendo em vista que a alta mortalidade envolvendo pacientes com GBM se dá devido a recorrência desse tumor a qual está correlacionada com a resistência celular aos tratamentos disponíveis, decidimos avaliar se a inibição da e5NT/CD73 e posterior tratamento com TMZ alteraria o padrão de crescimento das linhagens em uma avaliação de longo prazo (perfil de resistência). Para isso o experimento de *Cumulative Populaton Doubling* (CPD) foi realizado como descrito em materiais e métodos. A partir da análise dos gráficos é possível observar que nem a linhagem U251 foi sensível ao tratamento com TMZ, mas nem essa linhagem nem a U138 alteraram seus perfil de crescimento após inibição da e5NT/CD73 e tratamento com TMZ **(Figura 5 A e B)**.



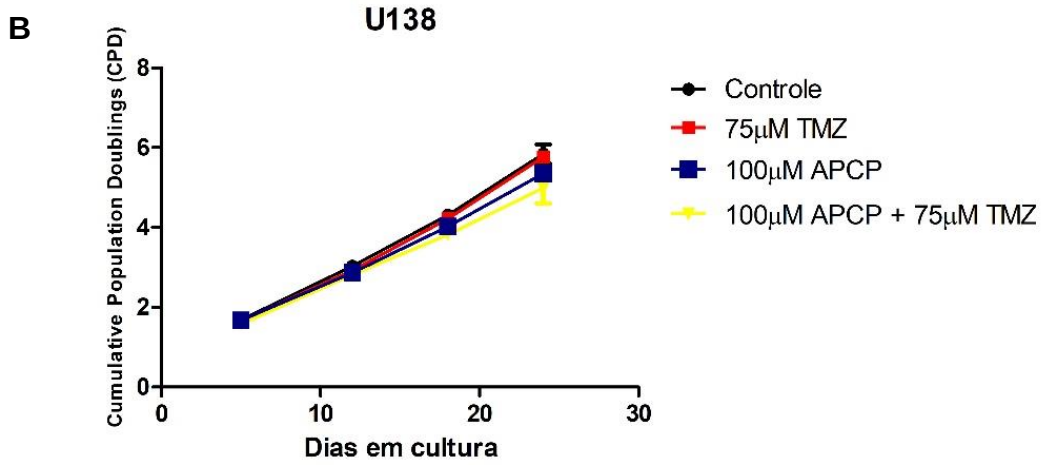


Figura 5: Os gráficos de Cumulative Population Doublings (CPD) mostram o perfil de proliferação ao longo de 28 dias em que as linhagens U251 (A) e U138 (B) foram tratadas e contadas conforme descrito em materiais e métodos. Na análise crônica, o efeito da inibição da CD73 no perfil de sensibilidade não demonstrou ser eficaz em diminuir o perfil de resistência das linhagens. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido por post-hoc de Tukey. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos de teste de interesse (TMZ x APCP + TMZ).

Modulação dos receptores de Ado e avaliação de sensibilidade aguda à TMZ

Sabendo que as linhagens estudadas até aqui não alteram seu perfil de sensibilidade a TMZ mesmo com inibição da e5NT/CD73, fomos verificar se a modulação dos receptores de adenosina como o A_2B e o A_3 seriam capazes de alterar o perfil de sensibilidade. O experimento em questão foi realizado apenas com a linhagem U251, pois fomos interrompidos devido a pandemia do SARS-COV-2. Foi possível observar que a utilização do antagonista de A_2B não foi capaz de alterar o perfil de sensibilidade da linhagem U251 **(Figura 6)** e que a utilização do antagonista de A_3 causou morte celular, mesmo na concentração de utilização usual, sendo então inconclusivo esse experimento **(Figura 7).**

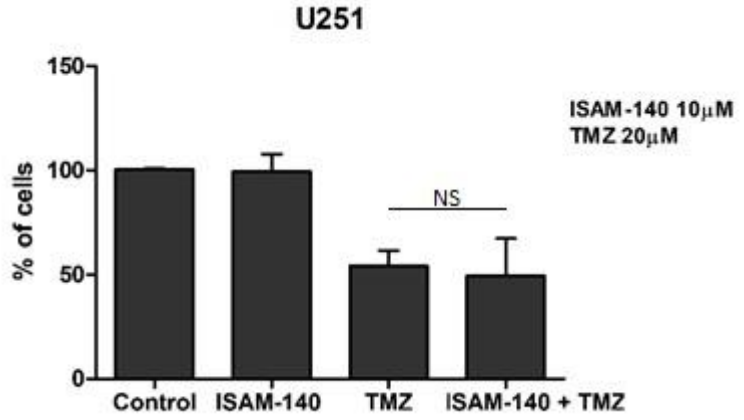


Figura 6: Os gráficos representam a sensibilidade da linhagem U251 frente TMZ com inibição do receptor A_{2B} por adição de ISAM-140. A contagem do número de células foi realizada após 5 dias de tratamento, conforme descrito em materiais e métodos. A linhagem U251 não altera sua sensibilidade à TMZ mesmo após inibição do receptor $_{A2B}$. Os valores representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido por post-hoc de Tukey. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos de teste de interesse (TMZ x ISAM-140 + TMZ).

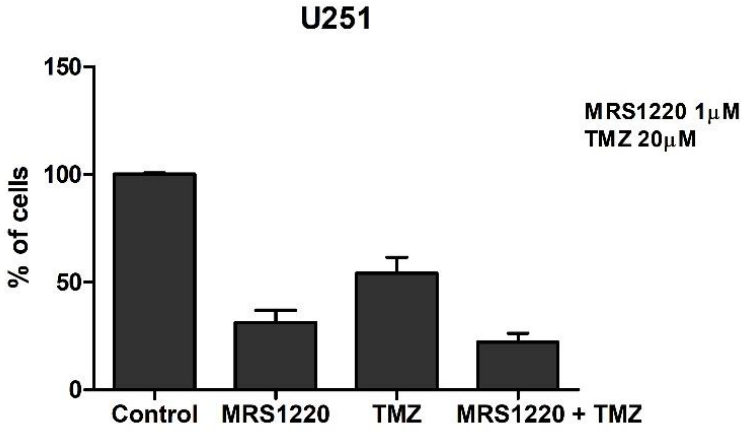


Figura 7: Os gráficos representam a sensibilidade da linhagem U251 frente TMZ com inibição do receptor A_3 por adição de MRS1220. A contagem do número de células foi realizada após 5 dias de tratamento, conforme descrito em materiais e métodos. O tratamento com MRS1220 demonstrou toxicidade celular mesmo utilizado em sua concentração usual. Para este experimento não foi realizada análise estatística, pois trata-se de um dado inconclusivo.

Discussão

Hoje em dia, fica cada vez mais evidente que o GBM dispões de diversos mecanismos celulares de resistência à quimioterápicos. Um dos mais bem descritos é a atuação da enzima O6-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT) que repara

os danos ao DNA causados por agentes alquilantes, como a TMZ, a carmustina (BCNU) e a nimustina (ACNU) (Stewart, 2002). Essa proteína atua na remoção dos grupos metil (CH_3) da posição O^6 da guanina, provenientes tanto do metabolismo celular normal ou fornecidos pelas drogas quimioterápicas alquilantes, para um sítio receptor e cisteína localizado na estrutura molecular da MGMT, que leva a sua inativação e degradação pela via proteossomal. Essa reação faz com que cada molécula da MGMT atue apenas uma única vez, portanto, as células dependem da síntese contínua de MGMT para reparar os danos ao DNA (Annovazzi, *et al*., 2015). Contudo, a simples presença ou não de MGMT, está longe de representar a resistência de gliomas à quimioterápicos. Existem diversos relatos na literatura associando outras vias com a resistência à TMZ, um exemplo a cerca desse fato é o status da proteína p53, que tem sido associado com a expressão de MGMT e resistência celular (Reisman et al., 2012). Outros estudos demonstraram que YKL-40, uma glicoproteína secretada por macrófagos e micróglia, está relacionada positivamente com a expressão de MGMT e que a regulação negativa desse gene aumentou a sensibilidade das células à TMZ (Akiyama *et al.,* 2014). Estudos mais recentes têm associados miRNAs com o desenvolvimento de resistência à quimioterápicos. Foi demonstrado que miR-16 e miR-21 desempenham um papel importante na regulação de resistência à TMZ, uma vez que, foi observado uma superexpressão desses miRNAs em linhagens de glioma resistentes e que a regulação negativa desses, levou ao aumento de sensibilidade nas células de glioma estudadas (Han e Chen 2015 e Wong *et al.,* 2012). Outros dados ainda demonstram que a resistência à TMZ em gliomas pode ser modulada pela formação de exossomos no tumor (Zeng *et al.,* 2017).

Nos últimos anos a e5NT/CD73 tem emergido como um potencial regulador de resistência celular em gliomas por ativação de receptores de Ado. Foi demonstrado que células de glioma de camundongo GL261 ao serem tratadas com antagonista do receptor A_{2B} aumentam sua sensibilidade à TMZ e quando tratadas com agonista de A_{2B} tornam-se mais resistentes, em um experimento com 72h de tratamento utilizando TMZ 30μM (Yan *et al.,* 2019). Outro estudo demonstrou que tanto o *knowdown* quando a inibição da e5NT/CD73 por APCP foram capazes de diminuir a resistência de células U87 de glioma humano e C6 de glioma de rato à TMZ em um experimento utilizando 100 μM de TMZ em uma avaliação de 72h (Azambuja *et al.* 2019). Esses dados corroboram com a ideia de que a e5NT/CD73 possa estar envolvida com a resistência de gliomas à TMZ.

Na primeira parte de nosso trabalho avaliamos a sensibilidade de duas linhagens de glioma humano U251 e U138, em concentrações e tempos condizentes com a prática clínica. Verificamos que TMZ é citotóxica para a linhagem U251 apresentando um valor de IC_{50} de 19,5 μM e que por outro lado, a linhagem U138 é altamente resistente, tendo um IC_{50} maior que 100 μM. Esse perfil de sensibilidade já era esperado e está de acordo com dados previamente descritos na literatura. Considerando nossas referências citadas, decidimos avaliar se a atividade da e5NT/CD73 poderia estar envolvida com os mecanismos de resistência presente nas linhagens estudadas. Como primeiro resultado avaliamos as concentrações de APCP necessárias para causar inibição na atividade da e5NT/CD73 nas linhagens por pelo menos 24h. Os resultados obtidos não demonstraram diferença estatística entre os grupos tradados nem nas maiores concentrações de APCP (100μM) e os grupos controles. Acreditamos que a não diferença numérica seja devido ao método de dosagem, o qual é um método colorimétrico e não altamente sensível. Outro

importante viés do presente estudo é que ao fazer a incubação do ensaio enzmático, o APCP que estava presente no tratamento das células em cultura é retirado do meio pela lavagem das células, fazendo com que a atividade da e5NT/CD73 pareça mais alta. Uma forma de resolver esse problema seria fazer a dosagem da atividade da e5NT/CD73 diretamente no meio em que as células foram tratadas. Apesar de não existir diferença estatística, é possível perceber uma queda na atividade da e5NT/CD73 após tratamento com APCP a partir de 50 µM em ambas as linhagens. Para U251 decidimos utilizar a concentração de 50 µM de APCP, uma vez que, essa concentração é capaz de reduzir a atividade da e5NT/CD73 sem interferir no crescimento celular (dados não mostrados). Seguindo o mesmo princípio, escolhemos o valor de 100 µM de APCP para U138.

Munidos dos valores de IC_{50} para TMZ de cada linhagem e as concentrações de APCP necessárias para diminuir a atividade da e5NT/CD73 por pelo menos 24h, fomos verificar se a inibição da atividade da e5NT/CD73 seria capaz de modificar o padrão de sensibilidade previamente estabelecido com TMZ. Divergindo dos dados da literatura, não encontramos relação entre a inibição da e5NT/CD73 e aumento da sensibilidade à TMZ nem na avaliação aguda e nem na avaliação crônica. Esses resultados nos fizeram levantar algumas hipóteses; a primeira delas é a concentração de TMZ utilizada para a linhagem U251. Por se tratar de uma célula consideravelmente sensível, a utilização do valor de IC_{50} pode ter sido um insulto forte demais para a linhagem, o que teria prejudicado na avaliação de uma diferença significativa no perfil de sensibilidade, em especial na avaliação crônica, pois as células demoraram muito para se recuperar e quando isso aconteceu o tempo de experimento já estava no final. Talvez para essa linhagem, uma estratégia mais inteligente seria a utilização do $IC_{75,}$ o que facilitaria a avaliação de modulação no

perfil de sensibilidade. No contraponto, temos a linhagem U138, que demonstrou ser altamente resistente aos valores de TMZ utilizados. Existem relatos na literatura que demonstram que as células U138 são as que mais expressam a enzima MGMT (TCGA Research Network). Levando esse dado em consideração, acreditamos que provavelmente a inibição da e5NT/CD73 e a redução de Ado no meio extracelular, não sejam capazes de modificar de forma significativa o perfil de sensibilidade dessa linhagem, visto que, o mecanismo que está melhor descrito para atividade da e5NT/CD73 e resistência está associada com a atividade de MRP1 e sua capacidade extrusão de drogas, como foi demonstrado por Quezada e colaboradores (2013) e possivelmente não teriam a capacidade de alterar a expressão de MGMT o qual é o principal mecanismo de resistência da linhagem U138. Portanto a utilização da inibição ou *knowdown* da e5NT/CD73 como estratégia de modular a resistência celular seria aplicável quando outros mecanismos de resistência estão envolvidos e não quando a expressão de MGMT é o principal fator. Neste ponto do trabalho, é importante salientar um fator importante que limita nossa discussão acerca do tema e5NT/CD73 e resistência, que é o viés de publicação. Existem apenas trabalhos publicados demonstrando a existência de uma relação positiva e nenhum trabalho que tivemos conhecimento demonstrando o oposto, ficando claro que existe uma tendência nesse tipo de publicação, o que limita o confronto de dados.

Finalmente, é sabido que pacientes com glioblastoma, apresentam alta resistência aos tratamentos disponíveis e que a recorrência é praticamente inevitável nesses pacientes. Levando esse fato em consideração, se faz necessário ampliar os conhecimentos dos mecanismos de resistência celular envolvendo o principal fármaco de tratamento dessa patologia, a TMZ. Considerando que a inibição ou

knowdown da e5NT/CD73 está descrito como potencial de sensibilizar as células aos quimioterápicos, seria uma estratégia interessante avaliar os efeitos da inibição da e5NT/CD73 frente à TMZ. Infelizmente, devido a pandemia de Covid-19 que se instalou no Brasil em março de 2020, não conseguimos avançar em nossas avaliações. Portanto, em relação aos nossos dados, não é possível chegar a uma conclusão clara entre o envolvimento da e5NT/CD73 e a resistência celular à TMZ. Outros estudos são necessários para avaliarmos uma possível relação.

PARTE III

4. DISCUSSÃO GERAL

Os GBMs são tumores astrocíticos malignos de classe IV, segundo a classificação da OMS, e representam os tumores cerebrais mais frequentes em adultos. Apesar de ser um câncer de baixa prevalência, estimada em 1/100.000, o GBM desperta grande interesse na pesquisa científica e clínica médica, devido à baixa sobrevida média dos pacientes diagnosticados (WHO, 2018). O tratamento de primeira linha é a cirurgia, tanto para confirmar o diagnóstico por uma biópsia, quanto para remover o quanto for possível de tumor. A remoção completa é raramente exequível, devido a uma das principais características desse tumor; a alta taxa de infiltração do parênquima cerebral, mesmo em casos iniciais da doença. O tratamento é então completado com radioterapia combinada com quimioterapia, normalmente TMZ ou nitrosureas. Em termos de sobrevida, os tratamentos pós cirurgia oferecidos são significativos, mas continuam bastante modestos, portanto, o prognóstico para pacientes com essa patologia segue desfavorável mesmo com todos os avanços tecnológicos (Johnson e O'Neill 2012)

Entre as alterações patológicas que conferem potencial invasivo às células tumorais, a sinalização purinérgica por meio de seus nucleotídeos, nucleosídeos, receptores e ectonucleotidases (NTPDases, NPPs e e5NT/CD73), tem emergido como um componente importante nessa complexa troca de informações no microambiente tumoral. Diversos estudos na literatura demonstraram tanto *in vitro, in vivo* e *ex vivo*, que estas vias de sinalização estão potencialmente envolvidas com a progressão do glioblastoma (Braganhol *et al.,* 2013). Gliomas apresentam uma baixa expressão de todas as NTPDases, quando comparado com os astrócitos em cultura, além disso, é sabido que a e5NT/CD73 é altamente expressa em gliomas e que o aumento de sua atividade está relacionado com a proliferação dessas células

(Bavarescoet *al*., 2008). Mais recentemente a e5NT/CD73 tem sido sugerida como um novo imuno *checkpoint*, devido à formação de adenosina (produto da reação enzimática) que promove a progressão tumoral por suprimir a resposta imune antitumoral e promover angiogênese (Chen et. al., 2019). Ademais, tem sido atribuído à e5NT/CD73 outras funções não estritamente relacionadas com sua atividade enzimática, como a adesão entre células e célula à matriz extracelular influindo nos processos de migração e invasão tumoral (Zhang 2012). Neste contexto, a busca pela compreensão do papel desses complexos mecanismos de sinalização na progressão e resistência tumoral continua sendo o foco de diversas pesquisas.

Previamente, nosso grupo de pesquisa verificou que células de glioma C6 implantadas em cérebros de ratos quando silenciadas para e5NT/CD73 não produzem massa tumoral, enquanto que o implante de células C6 (com baixas passagens em cultura) desenvolvem um tumor de dimensão e características histopatológicas de glioblastoma. Verificamos também que ao serem implantadas células C6 de altas passagens no tecido cerebral de ratos, tumores menores foram desenvolvidos e observamos que estas mesmas células possuíam atividade AMPásica consideravelmente menor que células C6 de baixas passagens, demonstrando uma interessante correlação entre atividade de e5NT/CD73 e crescimento tumoral (Campesato, 2010). Células C6 de baixa passagem são largamente utilizadas na pesquisa para estudar o comportamento do glioblastoma, entretanto, células C6 de alta passagem apresentam algumas semelhanças com astrócitos em cultura. Desse modo, na primeira parte da presente Dissertação, buscamos melhor compreender o envolvimento da e5NT/CD73 nas propriedades

malignas de linhagens C6 de ratos de alta e baixa passagens e a relação com a progressão tumoral.

Primeiramente, nós caracterizamos o perfil de atividades ATPásica, ADPásica e AMPásica nessas células C6. Como pode ser observado as linhagens possuem um perfil semelhante de hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP. Por outro lado, como esperado, as células C6 de alta passagem possuem uma menor capacidade em hidrolisar o AMP quando comparadas com as células C6 de baixa passagem. Corroborando com esse resultado, a análise da expressão das enzimas utilizando anticorpos específicos, por citometria de fluxo demonstrou que ambas as linhagens possuíam um perfil de expressão das NTPDases muito semelhante, com uma expressão baixíssima de NTPDase1, NTPDase2 e NTPDase3. Os gráficos apresentados podem nos dar a falsa impressão de que poderia existir uma diferença entre as linhagens, mas isso de fato ocorreu pela expressão ser tão baixa que uma pequena diferença numérica pode parecer uma diferença estatística, mas certamente essas mínimas diferenças numéricas não seriam suficientes para incrementar a atividade biológica. Além do mais, em relação à porcentagem de células marcadas com os anticorpos, tanto as células C6 de baixa passagem quanto as de alta passagem, possuem uma maior expressão de e5NT/CD73 do que qualquer uma das NTPDases. A principal diferença apresentada entre as linhagens é notavelmente a expressão da e5NT/CD73. Foi possível perceber que as células C6 diminuem a expressão proteica da e5NT/CD73 com o aumento do número de passagens.

Assim, sabendo que: a e5NT/CD73 está envolvida na proliferação de gliomas, uma vez que foi demonstrado que a atividade e expressão dessa enzima se elevam de acordo com o aumento da confluência celular em linhagens de glioma e que do

contrário, a inibição da e5NT/CD73 por APCP, inibidor específico da enzima, leva a uma menor proliferação (Bavaresco *et al.,* 2008) e que, a adenosina extracelular formada desempenha um importante papel no crescimento tumoral, angiogênese, resistência e imunossupressão, decidimos avaliar se a diferença de expressão da e5NT/CD73 poderia alterar a capacidade proliferativa dessas células. Em nossa avaliação de Ki67, importante marcador de proliferação celular, verificamos que em 48h as células C6 de alta passagem apresentaram uma vantagem proliferativa e que ao logo do tempo em cultura as células apresentam capacidades proliferativas muito semelhantes, demonstrando que a maior expressão da e5NT/CD73 nas células de baixa passagem, não é determinante para o crescimento celular *in vitro*. Por outro lado, a adição de AMP 50 µM foi capaz de aumentar a proliferação celular apenas nas células C6 de baixa passagem, demonstrando que nesta linhagem a presença de e5NT/CD73 e consequente formação de adenosina são fundamentais para modificar seu perfil de crescimento.

A formação de adenosina pode ser uma das explicações da importância da e5NT/CD73 na progressão dos tumores, diversos estudos têm demonstrado que a e5NT/CD73 pode regular processos como migração e invasão por vias adenosinérgicas. Por outro lado, alguns estudos na literatura relatam que a e5NT/CD73 pode promover a invasão por vias que não dependem de sua atividade enzimática, mas sim por ser uma proteína ancorada na membrana das células e ter capacidade de modificar a interação célula-célula e de interagir com a MEC. A invasão das células de glioma no tecido normal é um processo multifatorial que consiste nas células malignas primeiramente aderidas entre si, desprenderem-se, aderir-se nos componentes da matriz extracelular, seguido de proteólise desses componentes e migração para outras regiões (Engbring e Kleinman, 2003). Por essa

razão, como parte da caracterização das células C6, nós decidimos investigar se a e5NT/CD73 estaria relacionada com tais parâmetros de malignidade *in vitro*. Em nossas condições experimentais verificamos que as células de glioma C6 de alta passagem, que possuem menor expressão de e5NT/CD73, possuem uma maior aderência ao plástico e praticamente não são capazes de migrar, de maneira oposta, as células C6 de baixa passagem, que possuem maior expressão de e5NT/CD73 tiveram uma menor aderência ao plástico e foram capazes de migrar mais, comparada com as C6 de alta passagem, tanto nos ensaios de *Scratch-Wound* quanto do *transwell.* Além disso, a adição de APCP foi capaz de reduzir a migração, demonstrando que a migração das células C6 é dependente, pelo menos em parte, da atividade enzimática. Para esses resultados, uma perspectiva interessante seria a de realizar esses experimentos com plataformas enriquecidas com MEC e avaliar marcadores de transição epitélio-mesênquima nas duas linhagens, para podermos discutir de uma maneira mais específica a relação existente entre e5NT/CD73, MEC, migração e invasão. Todavia fica evidente a relação entre o potencial de migração e a expressão de e5NT/CD73.

O ensaio de formação de colônias demonstra a viabilidade reprodutiva da célula, ou seja, demonstra quanto uma célula é capaz de produzir clones (proliferar) e com isso formar colônias de células. Nossos resultados demonstraram que as células C6 de baixa passagem conseguem formar mais e maiores colônias, comparado com a C6 de alta passagem, mesmo que essas células apresentem uma capacidade proliferativa igual, demonstrada pela marcação com Ki67. Além disso a adição de APCP reduziu em 30% a formação de colônias nas células de baixa passagem. Esse resultado, atrelado aos anteriores, reforça a ideia de que o complexo microambiente extracelular gerado pela e5NT/CD73 é capaz de controlar

as interações entre célula-célula e célula-componentes, determinando se a célula irá aderir, migrar ou desprender completamente.

O modelo animal, utilizando o implante de células malignas no tecido cerebral de ratos, representa de forma mais fidedigna os mecanismos que ocorrem no crescimento de tumores em humanos e tem vantagem sobre métodos de avaliação mais simplificados, como os experimentos em cultura, nos quais não há reações inflamatórias e vasculares presentes (Grobben *et al*, 2002). Assim, o implante de células de glioma C6 de alta passagem no cérebro de ratos geraram tumores menores e menos malignos, enquanto que células C6 de baixa passagem desenvolveram um tumor de dimensão e características de glioblastoma. Quando se trata de modelos *in vivo*, sabemos que temos diversos fatores atuando que não estão presentes *in vitro*, principalmente o sistema imune e a inflamação. Neste contexto, acreditamos que as células C6 de alta passagem, formem tumores menores devido a menor expressão da e5NT/CD73 e consequente menor formação de adenosina no microambiente tumoral, que é pró-tumoral e moduladora da resposta imune, além da comprovada redução de capacidade migratória, que faz com que as células tumorais não consigam invadir os tecidos adjacentes. No que diz respeito aos modelos animais de glioblastoma, salientamos a importância da verificação da atividade da e5NT/CD73 nas células C6 de glioma de rato, antes de realizar o implante, uma vez que, demonstramos que células de maiores passagens perdem a atividade da e5NT/CD73 e não formam tumores característicos. Com isso, a avaliação da e5NT/CD73 se mostra um método rápido e barato de verificar anosidade das células C6 e garantir bons resultados futuros, quando se pretende usar essas células como modelo *in vitro* de gliomas. A partir das práticas estabelecidas em nosso laboratório, determinamos que uma atividade mínima de 60

nmol fosfato/min /mg de proteína, quando avaliada pelo método do Verde de Malaquita, é uma atividade segura para garantir um bom implante.

Como demonstrado anteriormente apoiada em uma série de referências, a alta expressão da e5NT/CD73 tem sido relacionada com o aumento de resistência a tratamentos e por outro lado, o silenciamento ou inibição da enzima tem sido associado com aumento de sensibilidade à quimioterápicos. Assim, na segunda parte do trabalho, investigamos o potencial envolvimento da e5NT/CD73 com a resistência à TMZ, o principal quimioterápico utilizado no tratamento de GBM. Infelizmente nossa avaliação ficou limitada pela interrupção dos trabalhos devido a pandemia de COVID-19. Conseguimos avaliar as linhagens celulares U251 e U138, duas linhagens de perfis opostos em relação a sensibilidade à TMZ. Nem a U251, célula de alta sensibilidade e nem a U138, célula bastante resistente, modificaram seu perfil de sensibilidade à TMZ em avaliações de curto e longo prazo após inibição da e5NT/CD73. Entretanto, apesar de nossos resultados não terem demonstrado uma relação direta entre inibição de e5NT/CD73 e aumento de sensibilidade à TMZ, não podemos descartar que essa relação seja uma hipótese verdadeira, uma vez que, avaliamos apenas duas linhagens celulares com perfis opostos. Fica evidente que para chegarmos a uma conclusão mais efetiva sobre esse assunto, se faz necessário ampliar as linhagens avaliadas, e buscar métodos mais efetivos de inibição da e5NT/CD73.

Finalmente, nossos resultados mostraram consistentes evidências do papel desempenhado pela e5NT/CD73 na progressão dos gliomas, já que uma menor expressão de e5NT/CD73 reduz significativamente a migração e a capacidade clonogênica *in vitro* e o crescimento tumoral *in vivo* e não descartamos a possibilidade do envolvimento da e5NT/CD73 com mecanismos de resistência à

quimioterápicos. Dado essa séria de relatos, fica cada vez mais evidente que a e5NT/CD73 pode constituir um excelente alvo, em combinação com outras estratégias terapêuticas, para abrandar o potencial maligno e invasivo do gliobastoma, reestabelecer a resposta imune anti-tumoral endógena e assim, melhorar o combate desta patologia e consequentemente, qualidade de vida dos pacientes.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho mostramos que a e5NT/CD73 promove a proliferação e a migração tanto *in vitro* quanto *in vivo* de células C6 de baixa passagem e que esse efeito é dependente da atividade enzimática da e5NT/CD73, fornecendo novas evidências do importante papel da e5NT/CD73 na progressão de gliomas.

6. PERSPECTIVAS

CAPÍTULO I

- Avaliar outros parâmetros envolvidos com a malignidade tumoral das células C6 de alta e baixa passagem, tais como ensaios de invasão e adesão com diferentes matrizes extracelulares.
- Avaliar marcadores da transição epitélio-mesênquima nas células C6 de alta e baixa passagem.

CAPÍTULO II

- Completar as avaliações utilizando as linhagens T98G e C6
- Avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na resistência à TMZ

7. REFERÊNCIAS

Akiyama, Y., Ashizawa, T., Komiyama, M., Miyata, H., Oshita, C., Omiya, M., Iizuka, A., Kume, A., Sugino, T., Hayashi, N., Mitsuya, K., Nakasu, Y., & Yamaguchi, K. (2014). YKL-40 downregulation is a key factor to overcome temozolomide resistance in a glioblastoma cell line. Oncology reports, v.32(1), p.159–166. https://doi.org/10.3892/or.2014.3195

Annovazzi, L., Caldera, V., Mellai, M., Riganti, C., Battaglia, L., Chirio, D., Melcarne, A., & Schiffer, D. (2015). The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. International journal of oncology, v.46(6), p.2299–2308. https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2963

Azambuja, J. H., Gelsleichter, N. E., Beckenkamp, L. R., Iser, I. C., Fernandes, M. C., Figueiró, F., Battastini, A., Scholl, J. N., de Oliveira, F. H., Spanevello, R. M., Sévigny, J., Wink, M. R., Stefani, M. A., Teixeira, H. F., & Braganhol, E. (2019). CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. Molecular neurobiology, 56(5), 3260–3279. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1240-4

Bar EE. Glioblastoma, cancer stem cells and hypoxia. (2011) Brain Pathol, v.21(2): p.119-129. doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00460.x. Epub 2010 Nov 30. PMID: 21054626.

Bardot V.; Dutrillaux A.M.; Delattre J.Y.; Vega F., Poissin M.; Dutrillaux B.; Luccioni C. (1994) Purine and pyrimidine metabolism in human gliomas: relation to chromosomal aberrations. Br J Cancer; v.70, n.2, p.212-228.

Bavaresco, L.; Bernardi, A.; Braganhol, E.; Cappellari, A.R.; Rockenbach, L.; Farias, P.; Wink M. R.; Canedo-Delgado, A.; Battastini, A.M.O. (2008) The role of ecto-5'-nucleotidase/Cd73 in glioma cell line proliferation. Mol. Cell. Biochem. v. 319, p.61-68.

Beauchesne P. (2011). Extra-neural metastases of malignant gliomas: myth or reality?. Cancers, 3(1), 461–477. https://doi.org/10.3390/cancers3010461

Bergamin L.S; Braganhol E; Zanin R.F; Edelweiss M.L.A; Battastini A.M.O; (2012) Ectonucleotidases in Tumor Cells and Tumor-Associated Immune Cells: An Overview. Journal of Biomedicine and Biotechnology.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem; v. 72, p.248-254.

Braganhol, E., Wink, M. R., Lenz, G., & Battastini, A. M. (2013). Purinergic signaling in glioma progression. Advances in experimental medicine and biology, 986, 81–102. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4719-7_5

Brandner,S., Jaunmuktane, Z. (2017). Neurological update: gliomas and other primary brain tumours in adults. Journal of neurology, v.265, p.717–727

Burnstock G. (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. Trends Pharmacol Sci.; v.27, n.3, p.166-176.

Burnstock G. (2007) Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. Physiol Rev; v.87, n.2, p.659-797.

Cambolat O; Durak I; Centin R; Kavutcu M; Demirci S; Ozturk S. (1996) Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. Brest Cancer Research Treat; v.37, n.2, p.189-93.

CAMPESATO, L.F. O silenciamento da ecto-5’-nucleotidase/CD73 altera a progressão de gliomas. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

Ceccareli. M., Bartherl. F., Malta. T., Sabedot. T., Noushmehr. H., Lavarone. A., Verhaak. R. (2016) Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. Cell, v.164, p.550-563. dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.028

Chan KM, Delfert D, Junger KD. (1968) A direct colorimetric assay for Ca^{2+}-stimulated ATPase activity. Anal Biochem; v.157, p.375-380.

Chen. S, Wainwright. D.A., Wu. J.D., Wan. Y., Matei. D.E., Zhang. Y., Zhang. B. (2019) CD73: an emerging checkpoint for cancer immunotherapy. Immunotherapy, v.11, p.983-997 doi: 10.2217/imt-2018-0200.

Cheng, L., Wub, Q., Guryanovab, O. A., Huang, Z., Huanga, Q., Rich, J. N., & Bao, S. (2011). Elevated Invasive Potential of Glioblastoma Stem Cells. *Biochemical and Biophysical Acta*, *406*(4), 643–648. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.123.Elevated

Coussy, F., Bonin, F., Azorin, P., Tariq, Z., & Driouch, K. (2019). Biologie des métastases et mécanismes moléculaires de leur formation [Biology of metastases and molecular mechanisms of their formation]. *Bulletin du cancer*, *106*(1), 24–36. https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.11.010

Cunha. M.L.V., e Maldaun. M.V.C (2019) Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. Revista da Associação Médica Brasileira, vol.65, p.424-433 http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.65.3.424

Desai. K., Hubben. A., Ahluwalia. M. (2019) The Role of Checkpoint Inhibitors in Glioblastoma. Targeted Oncology. https://doi.org/10.1007/s11523-019-00655-3

Dewhirst, M. W., Kimura, H., Rehmus, S. W., Braun, R. D., Papahadjopoulos, D., Hong, K., & Secomb, T. W. (1996). Microvascular studies on the origins of perfusion-limited hypoxia. The British journal of cancer. Supplement, v.27, p247–251.

Dombrowski KE, Trevillyan IM, Cone IC, Luy, Phillips CA. (1993) Identification and partial characterization of ecto ATPase expressed by human natural killer cells. Biochemistry. v.32, p.6515-6522.

Engbring, J. A., & Kleinman, H. K. (2003). The basement membrane matrix in malignancy. The Journal of pathology, 200(4), 465–470. https://doi.org/10.1002/path.1396

Gao, Z. W., Dong, K., & Zhang, H. Z. (2014). The roles of CD73 in cancer. BioMed research international, 460654. https://doi.org/10.1155/2014/460654

Gao, Z. W., Wang, H. P., Lin, F., Wang, X., Long, M., Zhang, H. Z., & Dong, K. (2017). CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. *BMC cancer*, *17*(1), 135. https://doi.org/10.1186/s12885-017-3128-5

Garrido, W., Rocha, J. D., Jaramillo, C., Fernandez, K., Oyarzun, C., San Martin, R., & Quezada, C. (2014). Chemoresistance in high-grade gliomas: relevance of adenosine signalling in stem-like cells of glioblastoma multiforme. Current drug targets, v.15(10), p.931–942.

Gilbert. M. R., Wang. M., Aldape. K. D., Stupp,. R., Hegi. M. E., Jaeckle. K. A. (2013) Dose-Dense Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Randomized Phase III Clinical Trial. Journal of clinical oncology, v.31, p32.

Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. (2014) A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. The New England journal of medicine, v.370, p.699-708.

Gramatzki D, Roth P, Rushing EJ, et al. (2018) Bevacizumab may improve quality of life, but not overall survival in glioblastoma: an epidemiological study. Annals of Oncology, v.29 p.1431–6.

Grobben, B., De Deyn, P. P., & Slegers, H. (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. Cell and tissue research, 310(3), 257–270. https://doi.org/10.1007/s00441-002-0651-7

Haar, C. P., Hebbar, P., Wallace, G. C., 4th, Das, A., Vandergrift, W. A., 3rd, Smith, J. A., Giglio, P., Patel, S. J., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2012). Drug resistance in glioblastoma: a mini review. Neurochemical research, 37(6), 1192–1200. https://doi.org/10.1007/s11064-011-0701-1

Han, J., & Chen, Q. (2015). MiR-16 modulate temozolomide resistance by regulating BCL-2 in human glioma cells. International journal of clinical and experimental pathology, 8(10), 12698–12707.

Holdhoff, M. and S.A. Grossman. (2011) Controversies in the adjuvant therapy of high-grade gliomas. Oncologist, v.16, p. 351-358.

Hsieh, C.H; (2015) Livin contributes to tumour hypoxia-induced resistance to cytotoxic therapies in glioblastoma multiforme. Clin. Cancer, v.21, p.460-469.

Jacobs V, Valdes P, Hickey W, De Leo J.A. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. NeuroReview; v.3, p.171-181.

Jacobson, K. A., & Gao, Z. G. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. Nature reviews. Drug discovery, 5(3), 247–264. https://doi.org/10.1038/nrd1983

Johnson DB, Sullivan RJ, Menzies AM. (2017) Immune checkpoint inhibitors in challenging populations. Cancer; v.123, p.1904–1911.

Johnson, D. R., & O'Neill, B. P. (2012). Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. Journal of neuro-oncology, 107(2), 359–364. https://doi.org/10.1007/s11060-011-0749-4

Kazazoglou T, Fleischer-Lambropoulos E, Geladopoulos T, Kentroti S, Stefanis C, Vernadakis A. Differential responsiveness of late passage C-6 glial cells and advanced passages of astrocytes derived from aged mouse cerebral hemispheres to cytokines and growth factors: glutamine synthetase activity. Neurochem Res; v.21, n.5, p.609–614, 1996

Kelly. W.J. e Gilbert. M. (2020) Glucocorticoids and immune checkpoint inhibitors in glioblastoma. Journal of Neuro-Oncology; v.151, p.13–20 https://doi.org/10.1007/s11060-020-03439-2

Kelly. W.J., Giles. AJ., Gilbert. M. (2020) T lymphocyte-targeted immune checkpoint modulation in glioma. Journal for ImmunoTherapy of Cancer; 8:e000379. doi:10.1136/jitc-2019-000379

Kumar V. (2013). Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go?. Purinergic signalling, v.9(2), p.145–165. https://doi.org/10.1007/s11302-012-9349-9

LAWS JR ER, SHAFFREY M.E. (1999.) The inherent invasiveness of cerebral Gliomas: implications for clinical management. Int. J. Neurosci. v.17, n.5-6, p. 413-420,

Leivas Pereira M.S.L, Zenki K, Cavalheiro M.M, Thome C, Chiela E, Lenz G, Souza D.O.G, Oliveira D.L. (2014) Cellular Senescence Induced by Prolonged Subculture Adversely Affects Glutamate Uptake in C6 Lineage. Neurochem Res; v.39, p.973–984.

Lemmens R, Vanduffel L, Teuchy H, Culic O. (1996) Regulation of proliferation of LLC-MK2 cells by nucleosides and nucleotides: the role of ecto-enzymes. Biochemical Jornal; v.316, p.551-557

Li, C.; Wang, S.; Yan, J.L.; Torheim, T.; Boonzaier, N.R.; Sinha, R.; Matys, T.; Markowetz, F.; Price, S.J. (2019) Characterizing tumor invasiveness of glioblastoma

using multiparametric magnetic resonance imaging. Journal of Neurosurgery. v.19, p.1–8.

Li, R. H., Hou, X. Y., Yang, C. S., Liu, W. L., Tang, J. Q., Liu, Y. Q., & Jiang, G. (2015). Temozolomide for Treating Malignant Melanoma. Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP, v.25(9), p.680–688.

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classi W cation of Tumours of the Central Nervous System. Acta Neuropathologica, v.114, p.97–109. https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, A. Von, Figarella, D., Webster, B., Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary. Acta Neuropathologica, v.131(6), p.803–820. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1

Mangoura D, Sakellaridis N, Jones J, Vernadakis A. Early and late passage C-6 glial cell growth: Similarities with primary glial cells in culture. Neurochemical Research; v.14, n.10, p.941-947, 1989.

Masui. K., Harachi. M., Cavenee. W. K., Mischel. P. S., Shibata. N. (2020) Codependency of Metabolism and Epigenetics Drives Cancer Progression: A Review. Acta histochemica et cytochemical, v.53, p.1-10.

McGirt, M.J., et al., (2009) Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma. Journal of neurology, v.110(1), p. 156-162.

Merighi, S., Benini, A., Mirandola, P., Gessi, S., Varani, K., Leung, E., Maclennan, S., Baraldi, P. G., & Borea, P. A. (2007). Hypoxia inhibits paclitaxel-induced apoptosis through adenosine-mediated phosphorylation of bad in glioblastoma cells. Molecular pharmacology, v.72(1), p.162–172. https://doi.org/10.1124/mol.106.031849

Mittal S, Klinger NV, Michelhaugh SK, Barger GR, Pannullo SC, Juhasz C. (2018) Alternating electric tumor treating fields for treatment of glioblastoma: rationale, preclinical, and clinical studies. J Neurosurg; v.2, p.414-421.

Najman, H. e Gadelha, M.I.P. (2002) Temozolamida. Revista Brasileira de Cancerologia, v.48(3): p.439-45, 2002.

Omay, S.B. and M.A. Vogelbaum, Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas. Indian J Cancer, 2009. V.46(2): p. 88-95.

Omuro. A., Vlahovic. G, Lim. M, Sahebjam. S, Baehring. J, Cloughesy. T. et al (2018) Nivolumab with or without ipilimumab in patients with recurrent glioblastoma: results from exploratory phase I cohorts of CheckMate. Neuro Oncol; v. 20(5), p.674–686.

Ostrom, Q.T., et al., The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. Neuro Oncol, 2014. 16(7): p. 896-913.

Parker K.K, Noorenberg MD, Vernadakis A. ‘‘Transdifferentiation’’ of C6 glial cells in culture. Science 208(4440): 179–181, 1980

Peng, H., Xue, R., Ju, Z., Qiu, J., Wang, J., Yan, W., Gan, X., Tian, Y., Shen, H., Wang, X., Wang, X., Ni, X., Yu, Y., & Lu, L. (2020). Cancer-associated fibroblasts enhance the chemoresistance of $CD73^{+}$ hepatocellular carcinoma cancer cells via HGF-Met-ERK1/2 pathway. Annals of translational medicine, 8(14), 856. https://doi.org/10.21037/atm-20-1038

Pistollato, F., Abbadi, S., Rampazzo, E., Persano, L., Della Puppa, A., Frasson, C., Sarto, E., Scienza, R., D'avella, D., & Basso, G. (2010). Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. Stem cells (Dayton, Ohio), v.28(5), p.851–862. https://doi.org/10.1002/stem.415

Quezada, C., Garrido, W., Oyarzún, C., Fernández, K., Segura, R., Melo, R., Casanello, P., Sobrevia, L., & San Martín, R. (2013). 5'-ectonucleotidase mediates

multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. Journal of cellular physiology, v.228(3), p.602–608. https://doi.org/10.1002/jcp.24168

Quincozes-Santos A, Rosa RB, Leipnitz G, de Souza DF, Seminotti B, Wajner M, Gonc¸alves CA. (2010) Induction of S100B secretion in C6 astroglial cells by the major metabolites accumulating in glutaric acidemia type I. Metab Brain; v.25, n.2, p.191–198.

Reardon DAOA, Brandes AA et al (2017) OS10.3 randomized phase 3 study evaluating the efficacy and safety of nivolumab vs bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma: Check- Mate 143. Neuro-Oncology 1(19(3):iii21

Reisman, D., Takahashi, P., Polson, A., & Boggs, K. (2012). Transcriptional Regulation of the p53 Tumor Suppressor Gene in S-Phase of the Cell-Cycle and the Cellular Response to DNA Damage. Biochemistry research international 808934. https://doi.org/10.1155/2012/808934

Silva, A. O., Dalsin, E., Onzi, G. R., Filippi-Chiela, E. C., & Lenz, G. (2016). The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. Experimental cell research, v.348(2), p.177–183. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.09.014

Silva, A. O., Felipe, K. B., Villodre, E. S., Lopez, P. L., & Lenz, G. (2016). A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, v.37(10), p.13743–13749. https://doi.org/10.1007/s13277-016-5255-z

Solomon MT, Selva JC, Figueredo J, Vaquer J, Toledo C, Quintanal N, et al. (2013) Radiotherapy plus nimotuzumab or placebo in the treatment of high grade glioma patients: results from a randomized, double blind trial. BMC Cancer, v.13 p.299.

Sonoda. Y. (2020) Clinical impact of revisions to the WHO classification of diffuse gliomas and associated future problems. International Journal of Clinical Oncology. doi.org/10.1007/s10147-020-01628-7

Strobel. H., Baisch. T., Fitzel. R., Debatin. K., Westho. M. (2019) Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. Biomedicines, v.7, p.1-16 doi:10.3390/biomedicines7030069

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. New England Journal of Medicine, v.352 p.987-996. doi: 10.1056/NEJMoa043330

Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G, Group EGW. (2014) High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology, v.3, p.93-101.

Sulman EP, Ismaila N, Armstrong TS, Tsien C, Batchelor TT, Cloughesy T. (2017) Radiation Therapy for Glioblastoma: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Guideline. J Clin Oncol, v.35, p.361-369

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J. S. (2015) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. Neuro-Oncology v.17:iv, p.1–iv62. https://doi.org/10.1093/neuonc/nov189

Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., & Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. Journal of Leukocyte Biology, v.86(5), p.1065–1073. https://doi.org/10.1189/jlb.0609385

Uribe, D., Torres, Á., Rocha, J. D., Niechi, I., Oyarzún, C., Sobrevia, L., San Martín, R., & Quezada, C. (2017). Multidrug resistance in glioblastoma stem-like cells: Role

of the hypoxic microenvironment and adenosine signaling. Molecular aspects of medicine, v.55, p.140–151.

Vaupel, P., Kallinowski, F., & Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. Cancer research, v.49(23), p.6449–6465.

Verhaak, R.G. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevantsubtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR,and NF1. Cancer Cell, v.17(1), p. 98-110.

Verkhrasky A.; Krishtai, O.; Burnstock, G. (2009) Purinoceptors on Neuroglia. Molecular Neurobiology, v. 39, n.3, p.190-208.

Vijayan, D., Young, A., Teng, M., & Smyth, M. J. (2017). Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. Nature reviews. Cancer, v.17(12), p.709–724. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.86

Wang, H., Lee, S., Nigro, C. L., Lattanzio, L., Merlano, M., Monteverde, M., Matin, R., Purdie, K., Mladkova, N., Bergamaschi, D., Harwood, C., Syed, N., Szlosarek, P., Briasoulis, E., McHugh, A., Thompson, A., Evans, A., Leigh, I., Fleming, C., Inman, G. J., … Crook, T. (2012). NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. *British journal of cancer*, *106*(8), 1446–1452. https://doi.org/10.1038/bjc.2012.95

Wesseling, P., and CappeR. D., (2018) Neuropathology and Applied Neurobiology. v.44, p.139–150. doi: 10.1111/nan.12432

Westphal M, Heese O, Steinbach JP, Schnell O, Schackert G, Mehdorn M, et al. (2015) A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. Eur J Cancer; v.51, p.522-532.

Wink, M.R.; Braganhol, E.; Tamajusuku, A.; Schwartsmann, G.; Casali, E.A; Karl, A. Barreto-Chaves, M.L; Sarkis, J.J.F; Battastini, A.M.O. (2003) Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. Neurichemistry Int;v.1367 p.1-8.

Wink, M.R.; Lenz, G.; Braganhol, E.; Tamajusuku, A.; Schwartsmann,G.; Sarkis, J.J.F; Battastini, A.M.O. (2003) Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. Cancer Letters, v.198, p.211-218

Wick W, Gorlia T, Bendszus M, et al. (2017) Lomustine and bevacizumab in progressive glioblastoma. New England Journal of Medicin, v.377, p.954–963.

Wong, S. T., Zhang, X. Q., Zhuang, J. T., Chan, H. L., Li, C. H., & Leung, G. K. (2012). MicroRNA-21 inhibition enhances in vitro chemosensitivity of temozolomide-resistant glioblastoma cells. Anticancer research, v.32(7), p.2835–2841.

Wood. M., Aaron M., Halfpenny. A. M., Moore. S. (2019) Applications of molecular neuro-oncology - a review of diffuse glioma integrated diagnosis and emerging molecular entities. Diagnostic Pathology, v.14, p.1-16

Xiong, L., Wen, Y., Miao, X., & Yang, Z. (2014). NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell and tissue research*, *355*(2), 365–374. https://doi.org/10.1007/s00441-013-1752-1

Yan, A., Joachims, M. L., Thompson, L. F., Miller, A. D., Canoll, P. D., & Bynoe, M. S. (2019). CD73 Promotes Glioblastoma Pathogenesis and Enhances Its Chemoresistance via A_{2B} Adenosine Receptor Signaling. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.39(22), p.4387–4402.

Yan. H., Parsons. W., Jin G., McLendon. G., Rasheed. A., Yuan. W., Kos. I., Batinic-Haberle. I., Jones. S., Riggns. G., Friedman. H., Friedman. A., Reardon. D., Herdon.

J., Kinzler. K., Velculescu. V., Volgestein. B., Bigner. D. (2009) IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. The New England Journal of Medicine, v. 360, p.765-773.

Yegutkin G.G. (2001) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. Biochem Biophys; v. 22, 2008.

Yu. W., Zhang. L., Wei. Q., Shao. A. (2020) O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. Frontiers in Oncology, v.9 doi: 10.3389/fonc.2019.01547

Zhang B. (2012). CD73 promotes tumor growth and metastasis. Oncoimmunology, 1(1), 67–70. https://doi.org/10.4161/onci.1.1.18068

Zeng, A. L., Yan, W., Liu, Y. W., Wang, Z., Hu, Q., Nie, E., Zhou, X., Li, R., Wang, X. F., Jiang, T., & You, Y. P. (2017). Tumour exosomes from cells harbouring PTPRZ1-MET fusion contribute to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastoma. Oncogene, 36(38), 5369–5381. https://doi.org/10.1038/onc.2017.134

Zeng, J., Chen, S., Li, C., Ye, Z., Lin, B., Liang, Y., Wang, B., Ma, Y., Chai, X., Zhang, X., Zhou, K., Zhang, Q., & Zhang, H. (2020). Mesenchymal stem/stromal cells-derived IL-6 promotes nasopharyngeal carcinoma growth and resistance to cisplatin via upregulating CD73 expression. Journal of Cancer, v.11(8), p.2068–2079. https://doi.org/10.7150/jca.37932

Zhu JJ, Demireva P, Kanner AA, Pannullo S, Mehdorn M, Avgeropoulos N et al. (2017) Health-related quality of life, cognitive screening, and functional status in a randomized phase III trial (EF-14) of tumor treating fields with temozolomide compared to temozolomide alone in newly diagnosed glioblastoma. J Neurooncol; v.135(3): p.545-552.

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

Zimmermann H. (2006) Ectonucleotidases in the nervous system. Pur Signalling neuron-glia; v. 276, p.113-130.

Zimmermann H, Zebisch M, and Strater N. (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Purinergic Signalling; v.8, n.3, p. 437–502.

8. ANEXOS

HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institucional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 08-578

Pesquisadores:
MARIA ISABEL ALBANO EDELWEISS
ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI
GUIDO LENZ
ANDRESSA BERNARDI
PATRICIA LUCIANA DA COSTA LOPEZ
LUIZ FELIPE INGRASSIA CAMPESATO
ALESSANDRA S. K. TAMAJUSUKU

Título: EFEITO DO SILENCIAMENTO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 NA PROLIFERAÇÃO DE GLIOMAS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA.
Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 02 de dezembro de 2008.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA