

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

Juliete Nathali Scholl

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS METABÓLICOS, PURINÉRGICOS E DE  
COMUNICAÇÃO INTERCELULAR NA IMUNOMODULAÇÃO E PROGRESSÃO  
DOS GLIOMAS DE GRAU II, III E IV**

Porto Alegre

2023

Juliete Nathali Scholl

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS METABÓLICOS, PURINÉRGICOS E DE  
COMUNICAÇÃO INTERCELULAR NA IMUNOMODULAÇÃO E PROGRESSÃO  
DOS GLIOMAS DE GRAU II, III E IV**

Tese 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 doutora em Bioquímica.

Orientador(a): Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Porto Alegre

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Scholl, Juliete Nathali  
Influência de parâmetros metabólicos, purinérgicos  
e de comunicação intercelular na imunomodulação e  
progressão dos gliomas de grau II, III e IV / Juliete  
Nathali Scholl. -- 2023.  
198 f.  
Orientador: Fabrício Figueiró.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Imunobioquímica do câncer. 2. Glioma. 3.  
Microambiente tumoral. 4. Linfócitos infiltrantes  
tumoriais. 5. Sistema purinérgico. I. Figueiró,  
Fabrício, orient. II. Título.

“I don’t know anything with certainty, but seeing the stars makes me dream. I dream my painting and I paint my dream. It is looking at things for a long time that ripens you and gives you a deeper meaning. Do not quench your inspiration and your imagination; do not become the slave of your model.”

Vincent Van Gogh

## AGRADECIMENTOS

Não só nesses últimos quatro anos, mas como em toda a minha vida, meus pais, Marcos e Seloní, permitiram que tudo isso fosse possível. São meus alicerces, sem os quais eu não poderia me firmar, são meus grandes incentivadores. Obrigada por tudo que me proporcionaram, por me guiarem e sempre apoiar;

Ao meu orientador, Fabrício, por tudo que me ensinou e pela confiança que depositou em mim. Tudo que sei sobre pesquisa devo a ele. Sou muito grata por todos os ensinamentos que recebi e tenho muito orgulho de ter feito parte desse grupo de pesquisa.

À professora Ana, por todo conhecimento compartilhado ao longo dos anos. És uma inspiração como professora e pesquisadora;

A todos do laboratório 22 que me acompanharam durante os 6 anos de pós-graduação: a convivência com vocês tornou tudo mais fácil e leve. Ao Augusto, Luiz, Roberta e Fabiana, muito obrigada pela amizade dentro e fora do laboratório. Em especial à Camila, pela amizade, apoio e conhecimento compartilhado, foi um dos presentes que o doutorado me trouxe;

A todos os demais colaboradores deste trabalho. Ao Dr. Paulo Worm e seus residentes, Diego, Eduardo, Wanderson e Willian, essa pesquisa não teria sido possível sem a colaboração vocês.

Ao Grupo de Inflamação e Senescência Celular por toda colaboração, disponibilidade e carinho.

Em especial, a todos os pacientes que aceitaram participar desse estudo;

A todos os meus amigos, por estarem sempre ao meu lado e me proporcionarem inúmeros momentos de alegria, afinal a felicidade só é verdadeira quando compartilhada.

Ao meu namorado, Lucas, por ser meu ponto de equilíbrio e por me inspirar, compreender e incentivar em todos os momentos. Obrigada por todo amor, carinho e, também, conhecimento compartilhado, és um exemplo de pesquisador. Agradeço também aos teus pais, Mari e Jorge, por todo carinho;

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial ao Giordano, por todos ajuda burocrática, mas principalmente pela amizade dentro e fora da bioquímica. À Ana e à Gabriela, por todo auxílio.

Por fim, agradeço ao CNPq, pela bolsa de doutorado, e às demais agências financiadoras que ofereceram recursos para a realização desta tese;

## APRESENTAÇÃO

Essa tese está organizada em três partes, cada uma sendo constituída dos seguintes itens:

**PARTE I:** Resumo, Resumo em inglês (Abstract), Lista de abreviaturas, Introdução e Objetivos;

**PARTE II:** Resultados, divididos em capítulos de 1 a 3;

**PARTE III:** Discussão, Conclusão, Referências bibliográficas citadas na introdução da parte I e discussão da parte III, e Anexos

Os trabalhos elaborados nessa tese foram desenvolvidos no Laboratório de Imunobioquímica do Câncer, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob orientação do Prof. Dr. Fabrício Figueiró.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS .....	12
INTRODUÇÃO.....	14
1. Tumores do Sistema Nervoso Central .....	14
1.1 Classificação dos tumores do SNC.....	15
1.2 Marcadores moleculares.....	17
1.2.1 Mutações em IDH1/2.....	18
1.2.2 Mutação em TP53.....	19
1.2.3 Mutações em ATRX .....	20
1.2.4 Hipermetilação de MGMT .....	20
1.3 Gliomas de alto e baixo grau .....	20
1.4 Glioblastoma.....	21
2 Microambiente Tumoral .....	22
2.1 Sistema imune .....	25
2.2 A sinalização purinérgica no TME.....	28
2.3 Reprogramação metabólica .....	29
2.4 Vesículas extracelulares .....	31
JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE .....	33
OBJETIVOS .....	34
Objetivo Geral.....	34
Objetivos específicos.....	34
CAPÍTULO 1.....	36
CAPÍTULO 2.....	68
CAPÍTULO 3.....	69
DISCUSSÃO .....	139
CONCLUSÃO .....	160
PERSPECTIVAS .....	163
REFERÊNCIAS .....	164
ANEXOS.....	188
Anexo I – Parecer consubstanciado CEP/UFRGS .....	188
Anexo II – Parecer Consubstanciado CEP/GHC.....	191
Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	194
Anexo IV - Artigos científicos publicados em coautoria durante o período do doutorado	197



# PARTE I

## RESUMO

O glioma é um tumor altamente agressivo que apresenta um prognóstico desfavorável. Em parte, a alta agressividade desse tumor está ligada ao grande poder infiltrativo e a grande heterogeneidade tumoral, com a presença de um microambiente tumoral imunossupressor. O microambiente tumoral é composto por diversas células neoplásicas em proliferação, fibroblastos, células endoteliais, células do sistema imune e moléculas que interagem entre si promovendo efeitos pró- e anti-tumorais. Em resposta às condições ambientais hostis, como falta de nutrientes e oxigênio, além de sinais oncogênicos, alterações moleculares e processos de sinalização celular, as células tumorais são capazes de modular o microambiente a fim de promover seu crescimento e invasão. Dessa forma, os tumores desenvolvem diversas estratégias para tornar o microambiente permissível à tumorigênese, promovendo inúmeros mecanismos imunossupressores. Nesse âmbito, a presente tese teve como objetivo investigar o papel do microambiente tumoral na imunomodulação e progressão tumoral nos graus II, III e IV de glioma. Foi observado que distintas populações celulares do microambiente tumoral são capazes de estabelecer uma complexa rede de interações e sinalizações célula-célula, favorecendo mecanismos de supressão, como a promoção da evasão imune por meio de células regulatórias e moléculas imunossupressoras, e a reprogramação metabólica. Metabolicamente, observou-se que gliomas de alto grau, com a mutação em IDH, apresentam um maior potencial fosforilativo. Em relação à imunomodulação, observamos linfócitos infiltrantes ativados, independentemente do grau; contudo, gliomas de baixo grau parecem desenvolver menos mecanismos imunossupressores que os gliomas de alto grau, sugerindo que o pior prognóstico associado a gliomas de grau IV está diretamente associado à imunossupressão. Adicionalmente, linfócitos infiltrantes tumorais superexpressam enzimas purinérgicas, favorecendo o aumento da produção da adenosina. Além disso, enfatizamos a importância da sinalização célula-célula por meio de vesículas extracelulares na imunomodulação do microambiente tumoral. Essas vesículas apresentam um grande potencial terapêutico e imunomodulatório, apresentando papéis anti- e pró-tumorais dependendo do contexto que se inserem. Dessa forma, nossos resultados enfatizaram as diferentes estratégias imunes e metabólicas desenvolvidas pelos diferentes graus de glioma, enfatizando um aumento do perfil imunossupressor em gliomas de alto grau. A compreensão dessas diversas estratégias desenvolvidas pelos tumores pode auxiliar na implementação de melhores regimes terapêuticos.

## ABSTRACT

Glioma is a highly aggressive tumor that has an unfavorable prognosis. The tumor aggressiveness is linked to the infiltrative phenotype and the tumor heterogeneity, with an immunosuppressive tumor microenvironment. The tumor microenvironment is composed of several proliferating neoplastic cells, fibroblasts, endothelial cells, immune system cells and molecules that interact with each other promoting pro- and antitumor effects. In response to hostile environmental conditions, such lack of nutrients and oxygen, in addition to oncogenic signals, molecular changes and cell signaling processes, tumor cells are able to modulate the microenvironment in order to promote their growth and invasion. Thus, tumors develop different strategies to make the microenvironment permissible for tumorigenesis, promoting numerous immunosuppressive mechanisms. In this context, this thesis sought to investigate the role of the tumor microenvironment in immunomodulation and the progression of gliomas of grades II, III, and IV. Our results reveals that different cell populations within the tumor microenvironment establish a complex network of cell-cell interactions and signaling. These interactions predominantly favor suppression mechanisms, including immune evasion through regulatory cells and immunosuppressive molecules, as well as metabolic reprogramming. Metabolically, it was observed that high-grade gliomas with the IDH mutation exhibit greater phosphorylative potential. Regarding immunomodulation, activated infiltrating lymphocytes were observed in all grades. However, it appears that low-grade gliomas develop fewer immunosuppressive mechanisms than high-grade gliomas, suggesting that the poorer prognosis associated with grade IV gliomas is directly linked to immunosuppression. Additionally, tumor-infiltrating lymphocytes overexpress purinergic enzymes, favoring increased adenosine production. Furthermore, we emphasize the importance of cell-cell signaling through extracellular vesicles in the immunomodulation of the tumor microenvironment. These vesicles have a great therapeutic and immunomodulatory potential, presenting anti and protumoral roles depending on the context in which they are inserted. In summary, our results highlight the diverse immune and metabolic strategies employed by different glioma grades, emphasizing an increased immunosuppressive profile in high-grade gliomas. A comprehensive understanding of these distinct strategies can contribute to the development of more effective therapeutic approaches.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>2-HG</b>	D-2-hidroxiglutarato
<b>ADO</b>	Adenosina
<b>ATRX</b>	gene da $\alpha$ -talassemia/retardo mental ligado ao X
<b>Breg</b>	Linfócitos B regulatórios
<b>DAMP</b>	Padrão molecular associado ao dano (do inglês, <i>danger-associated molecular pattern</i> )
<b>eATP</b>	ATP extracelular
<b>EMT</b>	Transição epitelial-mesenquimal (do inglês, <i>epithelial–mesenchymal transition</i> )
<b>E-NPP</b>	Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
<b>EVs</b>	Vesículas extracelulares (inglês, <i>Extracellular Vesicles</i> )
<b>EXOs</b>	Exossomos
<b>GB</b>	Glioblastoma
<b>GEV</b>	Vesículas extracelulares derivadas de glioma (do inglês, <i>Glioma-derived Extracellular Vesicles</i> )
<b>GHC</b>	Grupo Hospitalar Conceição
<b>GME</b>	Microambiente do glioma (do inglês, <i>glioma microenvironment</i> )
<b>HBSS</b>	Solução balanceada de Hank (do inglês, <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> )
<b>HGG</b>	Glioma de baixo grau (do inglês, <i>High Grade Glioma</i> )
<b>IDH</b>	Isocitrato Desidrogenase
<b>IDH-Mut</b>	Isocitrato desidrogenase mutada
<b>IDH-WT</b>	Isocitrato desidrogenase selvagem
<b>LGG</b>	Glioma de baixo grau (do inglês, <i>Lower Grade Glioma</i> )
<b>MGMT</b>	O6-metilguanina DNA metiltransferase
<b>MVs</b>	Microvesículas
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NTA</b>	Análise de rastreamento de nanopartículas (do inglês, <i>Nanoparticle tracking analysis</i> )
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OXPHOS</b>	Oxidação Fosforilativa
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares periféricas (do inglês, <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )

<b>PPP</b>	Via das pentoses-fosfato (do inglês, <i>pentose phosphate pathway</i> )
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i> )
<b>ROX</b>	Consumo de oxigênio residual (do inglês, <i>residual oxygen consumption</i> )
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TAM</b>	Macrófagos associados ao tumor (do inglês, <i>tumor-associated macrophages</i> )
<b>TCA</b>	Ciclo do ácido cítrico
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>Teff</b>	Linfócitos T efetores
<b>TEM</b>	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, <i>transmission electron microscopy</i> )
<b>TEV</b>	Vesículas extracelulares derivadas de tumores (do inglês, <i>tumor-derived Extracellular Vesicles</i> )
<b>TIL</b>	Linfócitos infiltrantes tumorais (do inglês, <i>tumor-infiltrating lymphocytes</i> )
<b>TME</b>	Microambiente tumoral (do inglês, <i>tumor microenvironment</i> )
<b>TMZ</b>	Temozolomida
<b>Treg</b>	Linfócitos T regulatórios
<b><math>\alpha</math>-KG</b>	$\alpha$ -cetogluturato

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se obtido crescente conhecimento a respeito da etiologia do câncer, uma doença complexa e multifatorial. Nos anos 2000, no artigo *Hallmarks of cancer*, Douglas Hanahan e Robert Weinberg enumeraram como principais fatores envolvidos na tumorigênese a autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais anticrescimento, evasão da morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase (Hanahan and Weinberg, 2000). À medida que o conhecimento a respeito dos mecanismos relacionados com a carcinogênese cresceu, graças ao avanço de tecnologias experimentais e computacionais, foram incorporadas novas características a fim de auxiliar a elucidar as complexas interações presentes nos tumores, buscando entender completamente os mecanismos de desenvolvimento e progressão tumoral. Atualmente, somados aos 6 *hallmarks* iniciais, são consideradas características comuns à maioria dos cânceres a desregulação do metabolismo celular, evasão imune, desbloqueio da plasticidade fenotípica e senescência. Além disso, na última década, foram adicionadas algumas características que possibilitam a aquisição desses *hallmarks*, como a inflamação como promotor da tumorigênese, instabilidade genômica, reprogramação genética não-mutacional e microbiomas polimórficos (Hanahan and Weinberg, 2011; Hanahan, 2022). Com a evolução do conhecimento relacionado a genética e biologia do câncer, essa doença mostra-se cada vez mais complexa e multifatorial.

### 1. Tumores do Sistema Nervoso Central

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) correspondem a um amplo grupo e altamente heterogêneo de doenças que apresentam características clínicas, biológicas e histológicas variadas, correspondendo a 2% de todos os tumores malignos do mundo (Ferreira e Rocha, 2004). Em 2020, os tumores do SNC apresentaram uma incidência, em nível mundial, de 308.102 novos casos e 251.329 mortes (Sung *et al.*, 2021). No Brasil, em 2020, ocorreram

9.355 óbitos por tumores do SNC e, em 2023, estima-se que ocorram 11.490 novos casos (INCA, 2022). Apesar de cerca de 68% dos tumores do SNC serem benignos (Ostrom *et al.*, 2017), esses tumores são caracterizados por altas taxas de morbidade e mortalidade devido sua localização e invasividade. Além disso, metástases cerebrais são de 5 a 10 vezes mais comuns que tumores cerebrais primários (Gavrilovic and Posner, 2005). Nesse âmbito, meningiomas e gliomas são os tumores cerebrais primários mais comuns. Os gliomas são os tumores do SNC mais frequentes em adultos, originam-se de uma célula glial ou células precursoras e representam, pelo menos, 80% dos tumores cerebrais malignos, com uma incidência de 3 - 5 por 100.000 pessoas por ano, podendo ocorrer em todas as faixas etárias, sendo mais prevalente em adultos maiores de 45 anos de idade (Schwartzbaum *et al.*, 2006; Furnari *et al.*, 2007; Porter *et al.*, 2010; Weller *et al.*, 2015). Além disso, apresentam características morfológicas e de expressão gênica semelhantes às células gliais. Histologicamente, eles são diferenciados como astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e oligoastrocitomas (Weller *et al.*, 2015).

### **1.1 Classificação dos tumores do SNC**

A classificação dos tumores do SNC amplamente adotada é organizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Nas últimas décadas, a classificação se baseou de acordo com características celulares microscópicas e seus níveis de diferenciação, em que a presença ou ausência de características anaplásicas atribui os graus de malignidade, podendo variar de grau I a IV, com o grau I indicando o comportamento menos agressivo. Nesse âmbito, os gliomas astrocíticos podem ser classificados de acordo com a classificação abaixo (Louis *et al.*, 2007; Sanai and Berger, 2018):

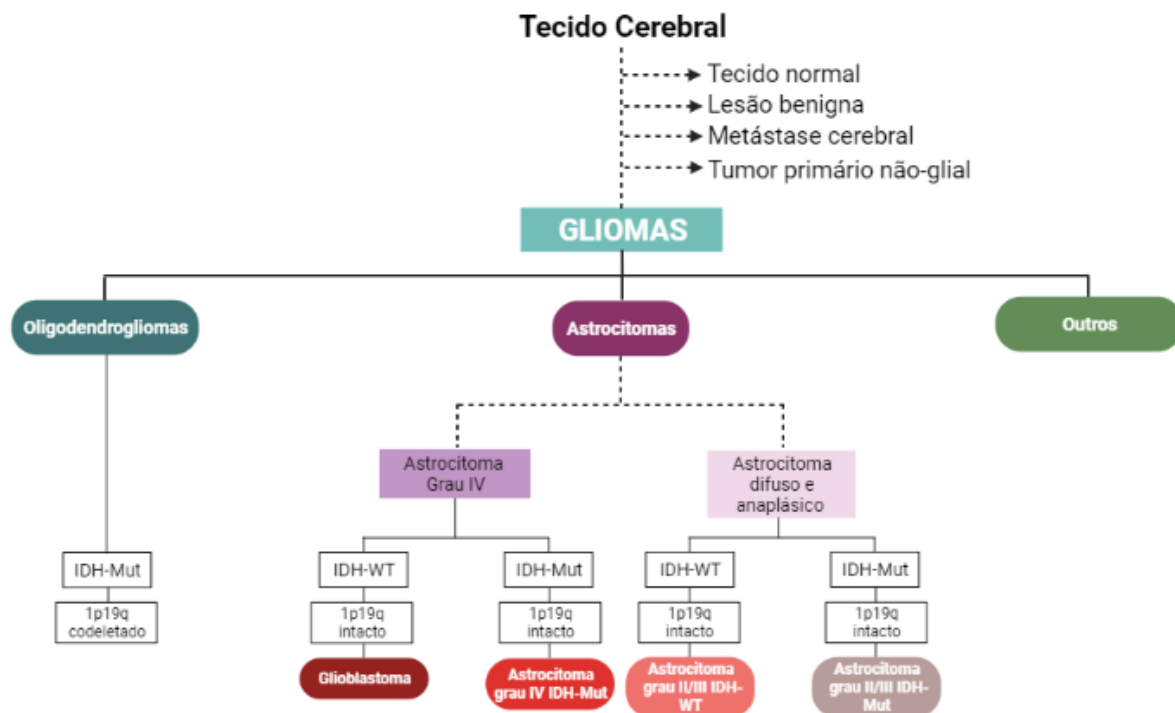
- Grau I: Tumores predominantemente pediátricos, benignos, comumente circunscritos e com baixo grau proliferativo. A ressecção cirúrgica costuma ter caráter curativo;

- Grau II: Astrocitomas difusos, comumente infiltrativos, porém com baixo grau proliferativo. Apresentam baixa atividade mitótica e podem apresentar atipia nuclear. A expectativa de vida é de cerca de 10 anos;
- Grau III: Astrocitomas anaplásicos, apresentam alto grau proliferativo e infiltrativo, aumento de densidade celular e atividade mitótica, com importante atipia nuclear. A expectativa de vida é de menos de 10 anos.;
- Grau IV: Astrocitoma de alto grau, altamente invasivo e proliferativo, além das características histológicas do grau III, também apresenta necrose e angiogênese. Apresentam um prognóstico desfavorável, com sobrevida de cerca de 12 a 15 meses.

Recentemente, tornou-se claro que essa divisão seria muito simplória dada a complexidade histológica e genética dos gliomas. Frente a isso, nos últimos anos, foram incorporados parâmetros moleculares na classificação dos tumores do SNC, como mutações no gene Isocitrato Desidrogenase (*IDH*) e *TP53*, codeleção de 1p19q, o status de expressão da enzima O<sup>6</sup>-metilguanina DNA metiltransferase (*MGMT*), deleção de *CDKN2A/B*, mutação em *TERT*, amplificação de *EGFR*, entre outros (David N Louis *et al.*, 2016; Louis *et al.*, 2021), complementando a classificação baseada em histologia e imunohistoquímica. Com essa mudança, busca-se um diagnóstico e prognóstico mais preciso, bem como um melhor direcionamento para o tratamento. A figura 1 ilustra as principais categorias dos tumores de acordo com a 5ª edição OMS (Louis *et al.*, 2021).



**Figura 1:** Classificação dos gliomas



**Figura 1: Classificação dos gliomas.** Classificação dos tumores do SNC de acordo com a nova versão da OMS (2021) com base em critérios histológicos e genéticos, com foco no *status* da IDH. Figura desenvolvida no BioRender.

## 1.2 Marcadores moleculares

Conforme discutido no tópico anterior, os gliomas são um grupo de tumores heterogêneos, com características moleculares e histológicas bastante variadas. Na última década, com a identificação de importantes alterações genéticas, epigenéticas e cromossômicas que participam da formação do glioma, a classificação molecular permitiu a identificação de marcadores prognósticos e subcategorias moleculares importantes na clínica (Louis *et al.*, 2021). Nesse contexto, mutações em *IDH1/2*, *TP53* e no gene da  $\alpha$ -talassemia/ retardo mental ligado ao X (*ATRX*), bem como a amplificação do gene *EGFR* e a hipermetilação do promotor do gene *MGMT*, tornaram-se particularmente relevantes no ponto de vista clínico.

### 1.2.1 Mutações em IDH1/2

A isocitrato desidrogenase é uma enzima que participa de diversos processos metabólicos, como o ciclo do ácido cítrico (TCA), metabolismo da glutamina, lipogênese e regulação redox (Lee *et al.*, 2004; Badur *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2020). Há três isoformas dessa enzima: a IDH1 é localizada no citoplasma e peroxissomos e as IDH2/3 encontram-se na matrix mitocondrial (Han *et al.*, 2020). Metabolicamente, as isoformas 1 e 2 são as mais importantes, pois os seus sítios catalíticos apresentam alta afinidade pelo isocitrato e, junto com NADP<sup>+</sup>, resultam na formação do  $\alpha$ -cetogluturato ( $\alpha$ -KG). Em cânceres, mutações da IDH costumam estar localizadas no resíduo de arginina, crucial para o reconhecimento de isocitrato (Yan *et al.*, 2009). Essas mutações *missense* resultam na substituição de um resíduo de arginina por um aminoácido de polaridade inferior, como a histidina, resultando numa menor afinidade ao isocitrato. É importante ressaltar que, normalmente, apenas uma cópia de IDH é mutada, formando heterodímeros com uma cópia da forma selvagem de IDH (IDH-WT) e uma cópia com a mutação (IDH-Mut). Isso resulta na capacidade, em células IDH-Mut heterozigotas, da cópia IDH-WT em converter o isocitrato a  $\alpha$ -KG, produzindo NADPH. Concomitantemente, a cópia mutante do dímero converte o  $\alpha$ -KG em D-2-hidroxiogluturato (2HG), um oncometabólito (Dang *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2020).

Inicialmente, mutações no gene *IDH* foram identificadas em tumores colorretais e no glioblastoma (GB) (Sjöblom *et al.*, 2006; Parsons *et al.*, 2008). Atualmente, sabe-se que essas mutações são frequentes em diversas neoplasias, como na leucemia mieloide aguda (Paschka *et al.*, 2010), no condrosarcoma (Amary *et al.*, 2011), no câncer de mama (Chiang *et al.*, 2016) e melanoma (Lopez *et al.*, 2010). A mutação em *IDH* promove a formação e acúmulo de 2HG, um oncometabólito responsável por bloquear a diferenciação celular e criar um microambiente permissivo para a transformação maligna (Carbonneau *et al.*, 2016; Waitkus, Diplas and Yan, 2018). Curiosamente, pacientes com glioma IDH-Mut apresentam um melhor prognóstico que

pacientes IDH-WT; contudo, os mecanismos relacionados a esta resposta continuam pouco elucidados. Observa-se, porém, que pacientes IDH-Mut respondem melhor ao tratamento (Houillier *et al.*, 2010; SongTao *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2017; Sun and Turcan, 2021). Em gliomas, inúmeras evidências sugerem que o *status* de IDH se correlaciona mais com o prognóstico que os critérios histológicos, uma vez que pacientes de baixo grau, porém com IDH-WT, apresentam comumente um pior prognóstico em comparação àqueles de grau alto IDH-Mut (TCGA, 2015). Essa classificação revolucionou o diagnóstico e manejo de pacientes e promoveu diversas alterações na forma de classificação desses tumores, como observado na figura 1. Cerca de 80% dos gliomas de baixo grau são IDH-Mut, assim como a maioria dos GB secundários (Yan *et al.*, 2009). Acredita-se que essas mutações ocorram inicialmente no processo de tumorigênese, persistindo no desenvolvimento do glioma a partir de uma célula-tronco (Dang *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Mutação em TP53

O gene *TP53* codifica a proteína p53, um importante supressor tumoral, a qual interfere no ciclo celular, na resposta ao dano ao DNA, na morte e diferenciação celular. A via de p53 é ativada em resposta ao estresse celular, facilitando o reparo ao DNA e induzindo morte celular em caso de dano ou mutações. Recentemente, p53 também foi reconhecido como um importante regulador do metabolismo celular e imunidade, além de estar envolvido em processos como autofagia, invasão e proliferação (Biegging, Mello and Attardi, 2014; Kasthuber and Lowe, 2017). A via de sinalização de p53 é alterada na maioria dos gliomas por meio de mutações *missense* amplificações de *TP53*, superexpressão de MDM2 ou perda da expressão de CDKN2A-p14<sup>ARF</sup> (Zawlik *et al.*, 2009; Crespo *et al.*, 2015), promovendo proliferação celular descontrolada e tumorigênese. Em pacientes com glioma, já foi descrito que a mutação de *TP53* está associada com progressão tumoral (Krex *et al.*, 2003), e a inativação de p53 se correlaciona com um fenótipo mais agressivo (Djuzenova *et al.*, 2015),

proliferativo (England, Huang and Karsy, 2013), e menos apoptótico (Park *et al.*, 2006). Em contrapartida, o *status* mutacional de *TP53* não se correlaciona com a sobrevida (Zhang *et al.*, 2018).

### 1.2.3 Mutações em *ATRX*

A partir da classificação da OMS de 2016, a detecção do *status* de *ATRX* foi adicionado no critério de classificação dos gliomas (Louis *et al.*, 2016). A proteína codificada por esse gene está envolvida em processos de recombinação e reparo do DNA, além de regulação transcricional gênica (Meng *et al.*, 2022), remodelação da cromatina e manutenção telomérica (Bassett *et al.*, 2008). A perda de expressão de *ATRX* por meio de mutações está comumente associada a mutações em *IDH* e *TP53* (Kannan *et al.*, 2012; Modrek *et al.*, 2017), correlacionando-se inversamente com a codeleção de 1p19q, associada a oligodendrogliomas (Sahm *et al.*, 2014). Dessa forma, a mutação em *ATRX* é comumente relacionada a um perfil tumoral astrocítico, auxiliando o diagnóstico e classificação molecular dos pacientes (Meng *et al.*, 2022).

### 1.2.4 Hipermetilação de *MGMT*

A *MGMT* é uma proteína responsável pelo reparo do DNA que neutraliza o dano gerado por agentes alquilantes. A metilação do promotor do gene que codifica essa proteína resulta no silenciamento do gene, aumentando a sensibilidade a agentes alquilantes, como a temozolomida (TMZ), tratamento quimioterápico padrão utilizado em glioma. Ela é considerada um importante preditor da resposta ao tratamento, sendo utilizado para definir estratégias de tratamento em pacientes com glioma (Weller *et al.*, 2010, 2015).

## 1.3 Gliomas de alto e baixo grau

Em 2015, foi realizada uma análise genômica integrativa de 293 pacientes com glioma difuso pela *Cancer Genome Atlas Network*, a qual resultou na classificação de três subtipos

distintos e robustos de gliomas de baixo grau de acordo com o status de *IDH*, *TP53* e codeleção de 1p19q (TCGA, 2015). Tumores astrocíticos difusos que possuem a mutação de *IDH*, ou seja, gliomas de grau II e III *IDH*-Mut, foram classificados como gliomas de baixo grau (LGG - do inglês, *Lower Grade Glioma*). Ao passo que gliomas de grau II e III *IDH*-WT foram agrupados com os gliomas de grau IV como gliomas de alto grau (HGG - do inglês, *High Grade Glioma*). A similaridade genética e clínica de gliomas de grau II e III *IDH*-WT com o GB primário fundamenta a inclusão desses casos dentro do amplo espectro de investigação clínica relacionado ao GB, incluindo protocolos de tratamento (TCGA, 2015).

#### **1.4 Glioblastoma**

O astrocitoma de grau IV, comumente nomeado de GB, é o mais maligno dos tumores gliais, está associado a uma baixa sobrevida e é caracterizado por grande heterogeneidade genética, morfológica e histológica intratumoral, a qual é composta por muitas células neoplásicas em proliferação, células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos (Balkwill, 2004; Solinas *et al.*, 2009). Além disso, apresenta características mais avançadas de malignidade, incluindo proliferação vascular e necrose (Cheng *et al.*, 2011; Weller *et al.*, 2015). Devido à alta capacidade infiltrativa dos gliomas, a completa ressecção cirúrgica é considerada improvável e a presença de células tumorais resulta na recorrência ou progressão maligna. Dessa forma, uma parcela dos LGG seguirão a história natural da doença e progredirão para HGG (Sanai and Berger, 2018). Nesses casos, esses tumores serão classificados como GB secundários. Em contrapartida, GB primários são tumores com origem *de novo*, sem progredir de um LGG, e representam grande parte dos casos de GB.

O GB é considerado incurável, com uma expectativa de vida média de 15 meses após o diagnóstico, em que apenas de 3 - 5% dos pacientes sobrevivem 3 ou mais anos. O tratamento padrão é composto pela ressecção tumoral, radioterapia e quimioterapia com o alquilante TMZ,

embora o tratamento continue paliativo para a maioria dos pacientes e a cura se mantém incerta (Stupp *et al.*, 2005, 2009). Os fatores relacionados a essa baixa sobrevida são a barreira hematoencefálica (Soffietti, Leoncini and Rudà, 2007), a alta capacidade infiltrativa e proliferativa desse tumor, grande heterogeneidade tumoral e a resistência ao tratamento, seja ela intrínseca ou adquirida ao tratamento padrão (Nagel *et al.*, 2017). Apesar dos crescentes esforços para o desenvolvimento de terapias personalizadas, poucos avanços foram observados nas últimas décadas.

Nesse âmbito, a heterogeneidade intra e intertumoral presente nos gliomas representa um dos maiores desafios para o seu tratamento (Swanton, 2012). A heterogeneidade intratumoral é definida pela presença de diferentes subpopulações celulares em um mesmo tumor, contribuindo para a agressividade e crescimento tumoral, além de favorecer a resistência ao tratamento. Esse é um fenômeno complexo e multifatorial, modulado por questões genéticas, epigenéticas e ambientais (Marusyk, Janiszewska and Polyak, 2020), o qual é uma peça essencial para a compreensão da história natural do tumor e a possível resposta ao tratamento. Atualmente, sabe-se que a grande heterogeneidade presente nos tumores é devida não só às múltiplas alterações genéticas, mas também pela composição dos seus microambientes. Inclusive, em resposta às complexas interações existentes entre células tumorais e não-tumorais, o microambiente tumoral (TME, do inglês, *tumor microenvironment*) está em constante transformação, ressaltando a sua importância no dinâmico processo da tumorigênese (Quail and Joyce, 2013).

## **2 Microambiente Tumoral**

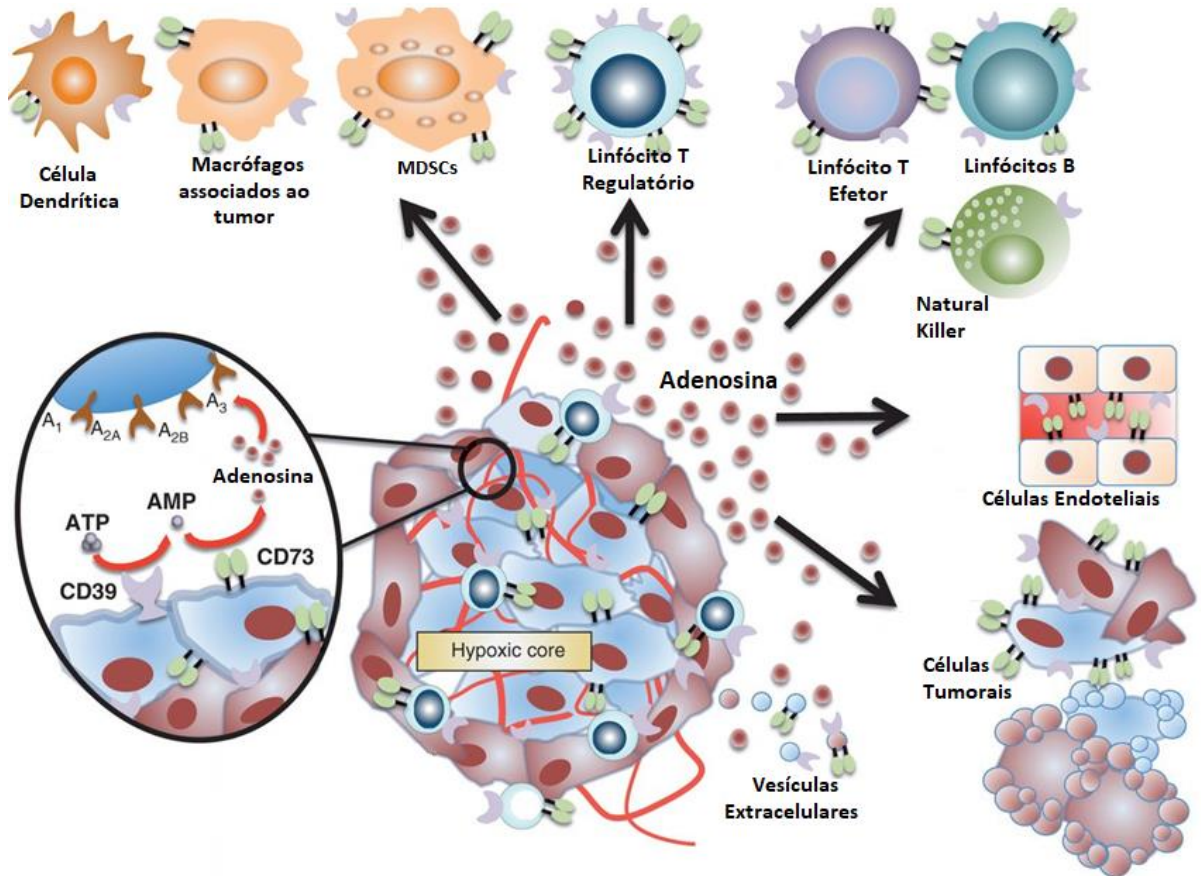
Durante muitas décadas, os tumores foram considerados apenas um caótico agregado de células proliferativas sem controle do ciclo celular devido a uma série de alterações genéticas. Apesar de correta, essa interpretação unidirecional acaba negligenciando o fato que os tumores

são um sistema complexo, contendo uma variedade de células e componentes capazes de favorecer as células tumorais, interagindo uns com os outros em nível celular e molecular, formando o TME (Hanahan and Coussens, 2012; Vogelstein *et al.*, 2013). A interação entre esses diferentes tipos celulares é capaz de remodelar diferentes nichos tumorais, resultando em diferentes microambientes dentro de um mesmo tumor. Assim, podemos observar áreas tumorais sólidas com diversas células em proliferação, além de áreas necróticas e perinecroticas, áreas perivasculares e regiões hipóxicas. Cada nicho está sujeito a diferentes formas de sinalização e modulação, reforçando a complexidade presente em cada tumor (Schiffer *et al.*, 2019).

Dessa forma, esse microambiente representa todos os componentes tumorais e não-tumorais presentes nesse complexo sistema, incluindo células tumorais altamente proliferativas ou infiltrativas, células tronco tumorais, além de células do sistema imune residentes e infiltrantes, como macrófagos e linfócitos, além de astrócitos, fibroblastos, células endoteliais e vesículas extracelulares (EVs, do inglês, *Extracellular Vesicles*). Essas células interagem umas com as outras dentro da matriz extracelular, na qual uma variedade de moléculas, produzidas por todas as células, influenciam a progressão tumoral (Schiffer *et al.*, 2019). O conjunto de células estromais intratumorais impõe diversos desafios para as células tumorais, como privação e competição por nutrientes, estresse oxidativo e vigilância imunológica. Por exemplo, fibroblastos associados ao câncer podem ser ativados, proliferar e secretar fatores de crescimento e citocinas, as quais podem recrutar células imunes e estimular a angiogênese (Lyssiotis and Kimmelman, 2017). A presença de uma vasculatura anormal nos tumores pode criar nichos hipóxicos no TME, o qual acaba limitando nutrientes e promovendo uma competição entre as células. Nesse sentido, a existência desse TME é assegurada pela interação de diversos *hallmarks* do câncer que permitem o desenvolvimento de múltiplas estratégias por parte do tumor na promoção de um fenótipo protumoral (Torrise *et al.*, 2022), como a evasão

ao sistema imune e a reprogramação metabólica. Dessa forma, conhecer os *hallmarks* do câncer que promovem o início e progressão dos gliomas torna-se crucial para melhor compreender a grande heterogeneidade desses tumores.

**Figura 2:** O microambiente tumoral



**Figura 2: O microambiente tumoral.** Os tumores desenvolvem diversas estratégias para tornar o microambiente permissível à tumorigênese. O microambiente tumoral representa todos os componentes tumorais e não-tumorais presentes na massa tumoral, incluindo células tumorais altamente proliferativas ou infiltrativas, células tronco tumorais, além de células do sistema imune residentes e infiltrantes, como macrófagos e linfócitos, além de astrócitos, fibroblastos, células endoteliais, adenosina e vesículas extracelulares. Essas células interagem umas com as outras influenciando a progressão tumoral. Adaptado de Young et al., 2014.



## 2.1 Sistema imune

Por muitos anos, acreditou-se que a barreira hematoencefálica era responsável por manter tumores cerebrais em um microambiente imunoprivilegiado. Atualmente, sabe-se que permeabilidade dessa barreira está alterada em inúmeras patologias, e diversas células imunes estão associadas com a progressão tumoral (Couto *et al.*, 2019). Além disso, por muito tempo, sugeriu-se que a aparente ausência de vasos linfáticos no SNC dificultaria a resposta imune antígeno-específica. Hoje, sabe-se que o SNC apresenta um sistema linfático que permite, pelo menos parcialmente, a interação de células imunes e antígenos tumorais com o sistema imunológico periférico (Louveau *et al.*, 2015; Louveau, Harris and Kipnis, 2015; Lan *et al.*, 2023). Apesar disso, os tumores do SNC não apresentam uma boa resposta a imunoterapias, sugerindo a necessidade de mais estudos sobre a resposta imune envolvida nesses tumores.

Nesse âmbito, o infiltrado inflamatório presente no microambiente varia em tamanho e composição e sua presença é uma evidência que apesar do desenvolvimento do tumor pelo organismo, esse busca interferir na progressão tumoral, processo conhecido como vigilância imune. A vigilância imunológica é um dos principais desafios que os tumores devem superar para crescer. Essa modulação, conhecida como imunoedição, pode ocorrer nos dois sentidos: erradicando células malignas ou promovendo crescimento e disseminação tumoral. Para escapar dessa vigilância, as células tumorais desenvolvem mecanismos para suprir a resposta imune. Evidências mostram que as células imunes apresentam diferentes estados de ativação e polarização e isso está diretamente relacionado com o papel que cada uma vai desempenhar dentro desse microambiente (Ruffell *et al.*, 2010; Bruno *et al.*, 2014).

As células imunes presentes no TME incluem as mediadoras da imunidade adaptativa, como linfócitos T e B, e as efetoras da imunidade inata, como macrófagos e células Natural Killer (NK) (Labani-Motlagh, Ashja-Mahdavi and Loskog, 2020). Os macrófagos costumam ser as células imunes intratumorais mais frequentes em pacientes com gliomas. Os macrófagos

residentes do SNC, também conhecidos como micróglia, constituem uma importante parte da totalidade da população glial e são considerados um componente crucial na primeira linha de defesa contra o tumor (Davies *et al.*, 2013), além de contribuírem ativamente para o desenvolvimento da homeostase do SNC, promovendo remoção de células apoptóticas, manutenção de sinapses e regulação da atividade neuronal (Casano and Peri, 2015). No contexto do glioma, já foi reportado que a micróglia favorece a capacidade infiltrativa do tumor (Bettinger, Thanos and Paulus, 2002; Bowman and Joyce, 2014). A permeabilidade da barreira hematoencefálica permite a entrada de macrófagos no parênquima tumoral. Os macrófagos associados ao tumor (TAM, do inglês, Tumor-Associated Macrophages), compostos pela micróglia e por macrófagos, compreendem uma população de células extremamente plásticas que adquirem fenótipos específicos em resposta aos sinais do microambiente local. Tradicionalmente, eles são divididos em subtipos M1 (pró-inflamatório, antitumoral) e M2 (anti-inflamatório, protumoral); contudo, o espectro dos TAM é muito mais diverso e altamente dinâmico (Gabrusiewicz *et al.*, 2016). A maioria dos TAM adquirem um fenótipo M2, produzindo um TME protumoral e imunossupressor, além de estimular angiogênese, invasão e migração tumoral (Noy and Pollard, 2014; Schiffer *et al.*, 2019).

Por outro lado, os linfócitos são um dos melhores exemplos para ilustrar que a alteração do fenótipo e ativação de uma célula pode influenciar diretamente o grau de agressividade do tumor. Os linfócitos infiltrantes tumorais (TILs, do inglês, *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*) incluem as diferentes subpopulações de linfócitos B e T, como as efetoras e regulatórias, bem como células linfoides inatas, como as NK e NKT. A presença de células T efetoras (Teff), como T CD4<sup>+</sup> auxiliares (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) e T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), e NKs estão associadas com uma imunidade antitumoral ao apresentar ou estimular citotoxicidade contra as células tumorais. Em contrapartida, células T CD4<sup>+</sup> regulatórias (Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) promovem uma imunidade pró-tumoral imunossupressora,

estimulando o escape imunológico, convertendo células T CD4<sup>+</sup> *naïves* a Treg, inibindo a ativação de linfócitos Teff e a atividade citotóxica de células T CD8<sup>+</sup> e NKs tanto por contato dependente quanto pela liberação de citocinas, como IL-10 e TGF-β (Fridman *et al.*, 2012; Bastid *et al.*, 2013; Borsellino *et al.*, 2016; Budhu *et al.*, 2017). De forma semelhante, há uma grande heterogeneidade fenotípica nos linfócitos B presentes no TME, tais como células B *naïves*, de memória, ativadas de memória e plasmoblastos, os quais podem tanto suprimir (B regulatórios – Breg, CD19<sup>+</sup>CD39<sup>high</sup>) quanto estimular a resposta efetora do sistema imune, gerando assim resposta anti- ou pró-tumoral, dependendo do sinal recebido (Figueiró *et al.*, 2016; Downs-Canner *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2023).

Nesse âmbito, gliomas malignos promovem uma série de mecanismos imunomodulatórios que podem resultar na supressão do sistema imune. Por exemplo, a hipóxia é um potente estimulador de angiogênese e induz produção de citocinas (Nogueira *et al.*, 2011). Além disso, a expressão de moléculas inibitórias, como os checkpoints imunes CTLA-4 e PD-1, favorecem a imunossupressão, auxiliando que as células tumorais não sejam eliminadas pelas células efectoras (Ghouzlani *et al.*, 2021). Nesse contexto, as interações no TME modulam seu estado metabólico, buscando favorecer o crescimento tumoral e evitar a destruição imune. Células supressoras podem ser tanto recrutadas dos tecidos linfoides (Treg naturais) como podem ser diferenciados de linfócitos T *naïves* (Treg induzidos) no microambiente dos gliomas (Sayour *et al.*, 2015). Estudos recentes mostram que Treg e Breg são capazes de produzir AMP e adenosina (ADO), pela presença das enzimas NTPDase1/CD39 e ecto-5'-nucleotidase/CD73 presentes na membrana plasmática, as quais são capazes de inibir a proliferação de linfócitos Teff (Saze *et al.*, 2013; Figueiró *et al.*, 2016). Essas enzimas estão envolvidas na sinalização purinérgica, responsável por hidrolisar o ATP extracelular (eATP) até adenosina, uma molécula imunossupressora.

## 2.2 A sinalização purinérgica no TME

A sinalização purinérgica desempenha um importante papel em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, como no câncer e na imunidade tumoral (Antonioli *et al.*, 2013; Cekic and Linden, 2016; Di Virgilio and Adinolfi, 2017). O sistema purinérgico é composto por nucleotídeos (como ATP) e por nucleosídeos (como a ADO) que, em geral, têm funções opostas em neoplasias sólidas e podem ser liberados no meio extracelular por diferentes mecanismos fisiológicos (exocitose, difusão e por transportadores) e patológicos (lise celular) (Yegutkin, 2008). O ATP intracelular é essencial para a homeostase, sendo a principal moeda de troca de energética na maioria dos processos metabólicos. Por outro lado, o eATP é um importante sinalizador e, através da ligação aos seus receptores P2, principalmente o P2X7, pode funcionar como molécula quimiotática para células imunes, além de ser potencialmente tóxico para células neoplásicas (Stagg and Smyth, 2010).

Em contraste as condições homeostáticas, os níveis de eATP se encontram altamente elevados devido a processos de morte celular, hipóxia e inflamação (Di Virgilio *et al.*, 2018). Por meio da ação das ectonucleotidases, especialmente a NTPDase1/CD39, o eATP pode ser hidrolisado a ADP e AMP. O AMP, por sua vez, é hidrolisado a ADO pela ecto-5'-nucleotidase/CD73. A ADO pode ser desaminada à inosina, e em seguida ser convertida a hipoxantina, a qual pode ser oxidada a xantina. Por fim, a xantina pode ser convertida em ácido úrico no meio extracelular (Bours *et al.*, 2006). A ADO também pode ser formada por uma via não-canônica, envolvendo a conversão de NAD<sup>+</sup>, um importante componente celular cuja concentração extracelular também aumenta em casos de lise celular, à ADPR pela ectoenzima CD38. A ADPR, a seguir, é convertida a AMP pela ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), CD203a. Ambas as vias convergem na CD73, que hidrolisa o AMP a ADO (Dwivedi *et al.*, 2021). Dessa forma, a ADO acaba acumulando-se no TME, favorecendo evasão imune, por meio da inibição de células Teff e estímulo as Treg, além

de favorecer a angiogênese, invasão e migração de células tumorais (Cekic and Linden, 2016; Vigano *et al.*, 2019).

Nesse âmbito, a ADO é descrita como molécula imunossupressora, facilitando o escape dos tumores ao sistema imune através da ligação aos receptores P1, principalmente receptor A<sub>2A</sub> (Antonioli *et al.*, 2013). De uma maneira geral, todos componentes do TME possuem a maquinaria necessária para produção de ADO e nucleotídeos associados, como ATP, ADP e AMP, contribuindo para a imunossupressão do TME. Por exemplo, a imunossupressão pelos Tregs pode se dar pela superexpressão da enzima NTPDase1/CD39 (Mandapathil *et al.*, 2010) que coordenadamente com células de GBM, que superexpressam ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Bavaresco *et al.*, 2008), produzem ADO pela hidrólise sequencial do ATP extracelular (Xu *et al.*, 2013).

### **2.3 Reprogramação metabólica**

As diferentes interações no TME modulam seu estado metabólico, buscando favorecer o crescimento tumoral e evitar a destruição imune. Nesse contexto, o TME é caracterizado por uma série de vias metabólicas desreguladas devido a fatores intrínsecos, como características genéticas, e extrínsecos, como a competição por nutrientes e pH, o que pode gerar a falta de nutrientes e acúmulo de resíduos metabólicos no TME. Esses resíduos metabólicos podem influenciar a expressão gênica e alterar o comportamento das células imunes intratumorais (DeBerardinis and Chandel, 2016; Pavlova, Zhu and Thompson, 2022). A grande capacidade invasiva dos gliomas se dá, em parte, à reprogramação metabólica do TME. Com esse processo, fornece-se substratos às células tumorais, as quais se adaptam para sobreviver ao complexo e hostil TME (Torrise *et al.*, 2022). Nesse âmbito, dependendo da disponibilidade de nutrientes, as células tumorais são capazes de utilizar uma série de vias alternativas para produção de

energia. Por esse motivo, tratamentos focando na privação de apenas uma via ou substrato dificilmente serão promissores.

Historicamente, o principal evento relacionado com a reprogramação metabólica é o Efeito Warburg, também conhecido como glicólise aeróbia, na qual células tumorais metabolizam a glicose e produzem lactato independentemente da disponibilidade do oxigênio (Warburg, Wind and Negelein, 1927). Essa característica auxilia o metabolismo anabólico necessário para promover o crescimento tumoral exacerbado. Recentemente, observou-se que a glicólise aeróbica não está envolvida na totalidade de ATP produzida em diferentes cânceres e que a maioria das células tumorais são capazes de produzir energia por meio da oxidação fosforilativa (OXPHOS), sugerindo que o Efeito Warburg seja apenas uma parcela de todas as vias metabólicas que se encontram alteradas na tumorigênese. No glioma, a maioria das vias metabólicas estão alteradas, tais como a glicólise, OXPHOS, síntese e oxidação de ácidos graxos e o metabolismo de aminoácidos (Garcia, Jain and Aghi, 2021). Nesse sentido, um importante ponto de convergência para os intermediários produzidos nessas vias é o ciclo do TCA. Mutações significativas em enzimas relacionadas ao ciclo do TCA são encontradas em gliomas, sendo a mutação na *IDH1/2* uma das mais importantes no ponto de vista clínico (Quinones and Le, 2018), conforme discutido no tópico 1.2.1. A flexibilidade metabólica proporcionada pelos múltiplos substratos do TCA permite que células tumorais respondam adequadamente aos metabólitos disponíveis no TME durante a tumorigênese. A combinação das diferentes interações no TME, associado com alterações moleculares, determina os substratos utilizados pelas mitocôndrias, centro da OXPHOS na célula, para sustentar a proliferação tumoral (DeBerardinis and Chandel, 2016).

É importante ressaltar que as células tumorais também são capazes de modular o sistema imune por meio da ação em vias bioenergéticas. Por exemplo, a ativação de células T *naïves* exige reprogramação metabólica. Após ativadas, as células Teff necessitam de mecanismos

bioenergéticos complexos para modular a ativação, proliferação e produção de citocinas, como o aumento do *uptake* de glicose e promoção da glicólise (Ho *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2020). O fenótipo metabólico adquirido por células efetoras é muito similar ao das células tumorais, priorizando a síntese de macromoléculas, proliferação e a necessidade de ATP. Além da dependência à glicose das células T, a função mitocondrial dessas células é de extrema importância para que elas desempenhem corretamente as suas funções efetoras. Inclusive, a perda de massa mitocondrial é uma característica de processos de exaustão celular (Scharping *et al.*, 2016). Dessa forma, a competição e escassez de energia nas células T é uma importante forma de imunossupressão (Ganeshan and Chawla, 2014; Allison, Coomber and Bridle, 2017).

#### **2.4 Vesículas extracelulares**

Além dos elementos citados acima, as EVs desempenham um papel essencial durante o processo de progressão e modulação do microambiente tumoral. Há três principais categorias de EVs: exossomos (EXOs), microvesículas (MVs) e corpos apoptóticos. Todas EVs apresentam uma bicamada lipídica; contudo, variam em tamanho, conteúdo e atividade biológica, desde comunicação intercelular (EXOs e MVs) até a renovação celular (corpos apoptóticos) (Kalra, Drummen and Mathivanan, 2016; Théry *et al.*, 2018). Os EXOs são pequenas partículas liberadas por uma variedade de células, como tumorais, embrionárias, dendríticas, macrófagos e células B, T e NK (Anand, 2010; Y. Xie *et al.*, 2010; Zumaquero *et al.*, 2010; Colombo, M; Raposo, G; Théry, 2014). Eles se originam do compartimento endossomal das células, em uma fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática (Trams *et al.*, 1981; Schorey and Bhatnagar, 2008; Colombo, M; Raposo, G; Théry, 2014). As MVs, por outro lado, se originam por exocitose por meio da membrana plasmática (Muralidharan-Chari *et al.*, 2009). Por esse motivo, essas vesículas, especialmente os EXOs, são muito semelhantes às células que as originaram em termos de conteúdo de proteína, mRNA

e microRNA (miR), além de expressarem uma série de antígenos tumorais quando secretados por células cancerígenas (Parolini *et al.*, 2009). Além disso, as EVs possuem um importante papel na comunicação intercelular com funções autócrinas e parácrinas, mediando a regulação e ativação da resposta imune (Montecalvo *et al.*, 2008). Por exemplo, EVs originadas de células T ativadas podem mediar a morte celular induzida por ativação, ao passo que EVs derivados de tumores podem imunizar contra o desafio tumoral, por meio da ativação de um sistema imune antitumoral (Bu *et al.*, 2015; Harshyne *et al.*, 2015) ou inibir o sistema imune pela liberação de citocinas e adenosina, criando um ambiente pró-tumoral (Clayton *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2019).

Devido a essas características, as EVs derivadas de tumores são sistemas eficientes para a transferência *in vivo* de sinais “*cross-talk*”, apresentando um papel central na geração e modulação do microambiente tumoral (Scholl *et al.*, 2020). Recentemente, inúmeros estudos têm relacionado o impacto das VEs derivadas de tumores com os *hallmarks* do câncer, evidenciando o papel de mediadoras nos principais processos anti e protumorais (Xavier *et al.*, 2020).



## **JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

A história do câncer deixa claro que, por muito tempo, o foco esteve sobre as próprias células malignas, em que mutações em oncogenes e genes supressores tumorais eram suficientes para determinar a tumorigênese e progressão tumoral. Nas últimas décadas, no entanto, ficou evidente o processo de transformação neoplásica evoluiu ao longo do tempo, envolvendo a progressão fenotípica e genotípica das células tumorais e a dinâmica interação com o seu microambiente. Nesse contexto, em resposta as condições ambientais hostis, como falta de nutrientes e oxigênio, além de sinais oncogênicos, alterações moleculares e processos de sinalização celular, as células tumorais são capazes de modular o microambiente a fim de promover seu crescimento e invasão. Dessa forma, os tumores desenvolvem diversas estratégias para tornar o microambiente permissível à tumorigênese, promovendo inúmeros mecanismos imunossupressores. Além disso, as consequências da interação entre as células tumorais e os demais componentes do microambiente tumoral para o desenvolvimento e progressão tumoral são amplamente discutidos e precisam ser elucidados. Compreender melhor as diversas interações, bem como os mecanismos que influenciam a progressão tumoral, especialmente em gliomas de baixo grau, pode auxiliar na implementação de melhores regimes terapêuticos.

Nesse âmbito, essa tese tem como objetivo explorar as diferentes estratégias desenvolvidas pelos gliomas que auxiliam a progressão tumoral. Nossa hipótese é que o microambiente tumoral dos gliomas de baixo e alto grau desenvolva distintos mecanismos modulatórios e supressores que favoreçam a progressão tumoral. Dessa forma, por meio processos de sinalização e comunicação celular, as células tumorais são capazes de modular o microambiente a fim de promover seu crescimento e progressão tumoral.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Investigar o papel do microambiente tumoral na imunomodulação e progressão tumoral nos graus II, III e IV de glioma

### **Objetivos específicos**

#### Capítulo 1:

Avaliar perfil do metabolismo energético de células tumorais e dos linfócitos infiltrantes tumorais em gliomas de diferentes graus (II, III e IV), associando com o *status* de IDH;

#### Capítulo 2:

Caracterizar as vias canônica e não-canônica do sistema purinérgico em linfócitos infiltrantes tumorais em gliomas de baixo e alto grau, associando com o *status* de IDH;

#### Capítulo 3:

Explorar o papel das vesículas extracelulares na imunomodulação e progressão tumoral.

## **PARTE II**

## CAPÍTULO 1

### **Glucose metabolism and immune tumor microenvironment confer special characteristics to lower and high-grade glioma**

Juliete Nathali Scholl, Camila Kehl Dias, Augusto Ferreira Weber, Lucas Kich Grun, Diego Zambonin, Eduardo Anzolin, Wanderson Willian Dos Santos Dias, Willian Pegoraro Kus, Florencia Barbé-Tuana, Fábio Klamt, Paulo Valdeci Worm, Fabrício Figueiró

**Periódico:** Journal of Neuro-Oncology

**Status:** Manuscrito a ser submetido à publicação

No presente estudo, em busca de avaliar a interação entre o microambiente tumoral imune e o metabolismo tumoral, correlacionando com o *status* de *IDH* e *p53*, avaliamos linfócitos infiltrantes de tumor e características metabólicas de células derivadas de pacientes com glioma. De uma maneira geral, quando comparamos os diferentes graus de glioma, observamos alterações no metabolismo da glicose e a uma maior presença de células imunes supressoras em gliomas de alto grau. As maiores diferenças em relação ao status de *IDH* referem-se ao metabolismo da célula tumoral, em que gliomas de alto grau com a mutação em *IDH* apresentam maior potencial para oxidação fosforilativa. Além disso, gliomas de alto grau que superexpressam *p53* estão associados com funções imunossupressoras e alterações no metabolismo energético.

## CAPÍTULO 2

### **Characterization of purinergic signaling in tumor-infiltrating lymphocytes from lower- and high-grade gliomas**

Juliete Nathali Scholl, Augusto Ferreira Weber, Camila Kehl Dias, Vinícius Pierdoná Lima, Lucas Kich Grun, Diego Zambonin, Eduardo Anzolin, Wanderson Willian Dos Santos Dias, Willian Pegoraro Kus, Florencia Barbé-Tuana, Ana Maria Oliveira Battastini, Paulo Valdeci Worm, Fabrício Figueiró

**Periódico:** Purinergic Signalling

**Status:** Publicado

No capítulo anterior, demonstramos que gliomas de baixo e alto grau se diferenciam em parâmetros metabólicos e imunes. Já nesse estudo, buscamos caracterizar o microambiente tumoral em relação as ectoenzimas purinérgicas e receptores P1, com foco nos linfócitos infiltrantes tumorais. De uma maneira geral, demonstramos que as ectoenzimas da via canônica e não-canônica estão aumentadas nos linfócitos infiltrantes tumorais quando comparadas ao sangue periférico. Nossa hipótese é que esse aumento favorece a geração de adenosina, favorecendo a imunossupressão do microambiente tumoral.

## **CAPÍTULO 3**

### **Papel das vesículas extracelulares na progressão tumoral**

Esse capítulo objetiva elucidar o papel das vesículas extracelulares no contexto do glioma e é composto por dois artigos publicados e uma seção de resultados preliminares.

**Extracellular vesicles in cancer progression: are they part of the problem or part of the solution?**

Juliete Nathali Scholl, Camila Kehl Dias, Laurent Muller, Ana Maria Oliveira Battastini & Fabrício Figueiró

**Periódico:** Nanomedicine

**Status:** Publicado

Nesse artigo de revisão, exploramos o papel dual que vesículas extracelulares podem desempenhar na imunomodulação e progressão tumoral, associadas a mecanismos pro e antitumorais.

## **Characterization and antiproliferative activity of glioma-derived extracellular vesicles**

Juliete Nathali Scholl<sup>1</sup>, Amanda de Fraga Dias, Pauline Rafaela Pizzato, Daniela Vasconcelos Lopes, Cesar Eduardo Jacintho Moritz, Elisa Helena Farias Jandrey, Gabriele Dadalt Souto, Mariana Colombo, Francieli Rohden, Jean Sévigny, Adriana Raffin Pohlmann, Sílvia Stanisçuaski Guterres, Ana Maria Oliveira Battastini, Fabrício Figueiró

**Periódico:** Nanomedicine

**Status:** Publicado

Nesse artigo, propomos dois modelos de tratamento *in vivo* utilizando vesículas extracelulares derivadas da linhagem C6 de glioma. Em ambos os modelos, observamos uma diminuição do volume tumoral, acompanhado de redução da infiltração de células regulatórias. A redução tumoral foi associada a um efeito antiproliferativo desempenhado pelas vesículas, sugerindo que nos modelos propostos essas vesículas desempenhariam um papel antitumoral.



**Avaliação do papel imunomodulatório das vesículas extracelulares derivadas de glioma**

**Status:** Resultados Preliminares

## **1. Justificativa**

O glioma é um tumor altamente agressivo que apresenta um prognóstico desfavorável. Em parte, a alta agressividade desse tumor está ligada ao grande poder infiltrativo e a grande heterogeneidade tumoral, com a presença de um TME imunossupressor. O TME é composto por diversas células neoplásicas em proliferação, fibroblastos, células endoteliais, células do sistema imune e moléculas que interagem entre si promovendo efeitos pró- e anti-tumorais. As células imunes presentes no TME são moduladas por múltiplos fatores e componentes, tanto por contato físico quanto por fatores solúveis endógenos, conforme discutido nos capítulos anteriores dessa tese. Nesse contexto, as EVs emergiram como um grande contribuidor na formação e modulação do TME, estando envolvidas na comunicação entre células tumorais e não-tumorais e o microambiente em que residem. Além de realizar a comunicação célula-célula, as EVs estão intimamente relacionadas com o transporte de diferentes moléculas de sinalização, mRNA e microRNAs entre todas as células do TME, sendo um importante condutor para as diferentes interações que ocorrem no TME.

Dessa forma, as EVs emergiram como um importante regulador da resposta imune durante a progressão tumoral, desempenhando um papel crítico na imunomodulação. Elas são capazes de promover evasão imune, além de possuírem propriedades imunogênicas, conforme amplamente discutido na revisão presente nesse capítulo. O objetivo da terceira parte desse capítulo é explorar as propriedades imunomodulatórias das vesículas extracelulares derivadas de glioma (GEVs), buscando correlacionar o grau do glioma e resposta imune desencadeada pela EVs e entender mais profundamente a imunossupressão presente no TME de pacientes com glioma.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Aspectos éticos e amostras biológicas**

As amostras tumorais foram obtidas a partir de pacientes submetidos a ressecção cirúrgica parcial ou total do tecido tumoral no Grupo Hospitalar Conceição (GHC, Porto Alegre-RS) a partir de janeiro de 2021 até dezembro de 2022. A partir desta ressecção, o material da biópsia foi encaminhado para análise histopatológica e outra parte destinada ao preparo do cultivo primário. Todas as amostras de biópsia foram avaliadas e diagnosticadas por um médico patologista a fim de confirmar a histologia e o estadiamento do glioma. Todos os pacientes foram submetidos ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexos I e II).

### **2.2 Estabelecimento e manutenção da cultura primária**

Os fragmentos tumorais foram acondicionados em meio DMEM contendo 0.5 U/ml de penicilina/estreptomicina e anfotericina B, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) desde a cirurgia até o momento do processamento. O processamento foi realizado, idealmente, em até 1 hora após a coleta e consiste em duas formas de dissociação: a mecânica, macerando o fragmento com um bisturi, e a enzimática, com uma solução de dissociação que consiste em colagenase IV (200 U/mL) e DNase I (28 U/mL), diluídas em tampão HBSS. A solução de dissociação contendo o tumor foi mantida em estufa (37°C) por 45 minutos em agitação suave. Por fim, após uma centrifugação, as células são ressuspensas em meio DMEM/F-12, contendo 0.5 U/ml de penicilina/estreptomicina e anfotericina B, suplementado com 10% de SFB e mantidas em incubadora a 37°C, com 95% de umidade relativa e 5% de CO<sub>2</sub>. A troca de meio de cultura foi realizada três vezes por semana e fotos foram obtidas para o acompanhamento e observação da morfologia celular.

### **2.3 Isolamento e caracterização de vesículas extracelulares derivadas de gliomas (GEVs)**

Para a realização do isolamento das GEVs, culturas primárias derivadas de quatro gliomas (grau II, III e IV IDH-Mut e IDH-WT) foram mantidas em garrafas de cultura de 182 cm<sup>2</sup> em DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB depletado por 48 horas. A depleção de EVs do SFB é realizada por meio de duas ultracentrifugações a 105.000 xg por 3 horas cada.

As VEs foram isoladas a partir do sobrenadante das culturas primárias de acordo com o protocolo padronizado no artigo 2 desse capítulo. Brevemente, o sobrenadante foi submetido a centrifugações diferenciais para remoção de “debris” celulares e partículas maiores. Após, o sobrenadante é ultracentrifugado a 105.000 x g por 120 min, duas vezes. A concentração de proteína das EVs foi quantificada por ensaio de BCA (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific™, USA) e as partículas foram caracterizadas pelo diâmetro e concentração (número de partículas/mL) através do equipamento NanoSight LM10 (Nanosight, UK), em uma diluição de 1:40, e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para a TEM, 10 µL das GEVs foram pipetadas numa grade e contrastados com acetato de uranila a 2%. Além disso, foi avaliada a expressão de CD9 por citometria de fluxo para confirmar a presença de vesículas extracelulares (Suárez *et al.*, 2017).

### **2.4 Purificação de células mononucleares periféricas (PBMCs)**

Amostras de sangue foram obtidas de três indivíduos saudáveis. Células mononucleares foram isoladas por meio do gradiente de densidade Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) e ressuspendidas em RPMI 10% SFB numa concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. Para avaliação dos efeitos imunomodulatórios das VEs nos linfócitos, as PBMCs foram ativadas com PMA (50 ng/mL) e ionomicina (1000 ng/mL) por 4 horas. Após a ativação, as células foram tratadas com 16 µg/mL de GEVs por 48 horas. Os controles foram tratados com PBS.

## 2.5 Internalização das GEVs

Para avaliar a capacidade dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de internalizar as GEVs, as vesículas foram marcadas com 40 µM de CFSE (BD Biosciences) por 10 minutos. Após, foram ressuspendidas em meio DMEM/F-12 10% SFB depletado e ultracentrifugadas a 105.000 xg por 2 horas. Após a ultracentrifugação, GEVs foram ressuspendidas em PBS. PBMCs ativadas foram tratadas com 16 µg/mL de GEVs marcadas por 48 horas. Como controle negativo, a mesma quantidade de CFSE foi ultracentrifugada sem a presença de GEVs, utilizando apenas PBS. Após esse período, a internalização foi avaliada no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences).

## 2.6 Efeitos imunomodulatórios das GEVs

### 2.6.1 Apoptose

Foi avaliada a apoptose de linfócitos T CD8<sup>+</sup> por meio do kit de Anexina V FITC (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, GEVs (16 µg/mL) ou PBS (controle) foram coincubados com 5 x 10<sup>5</sup> PBMCs ativados. Após 48 horas de incubação, os linfócitos foram marcados com anexina V-FITC e CD8-APC para a avaliação do apoptose. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences).

### 2.6.2 Avaliação de ativação e regulação

Foi avaliada a presença de marcadores de ativação (CD25 e CD69), checkpoints imunes (CTLA4 e PD1) e regulatórios (FoxP3) nas PBMCs ativadas coincubadas com GEVs (16 µg/mL). Brevemente, após as 48 horas de incubação, as células foram incubadas com os anticorpos de membrana por 30 minutos. Para a marcação intracelular (FoxP3), células foram fixadas e permeabilizadas (Cytotfix/Cytoperm, BD Biosciences). As células foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS CantoII (BD Biosciences) e analisadas pelo software FlowJo.

Foram utilizados dois painéis de anticorpos: *painel de ativação*, composto pelos anticorpos CD4 (Pacific Blue), CD279 (PD-1, FITC), CD69 (PE), CD8 (PE-Cy7) e CD152 (CTLA4, APC) e o *painel de supressão*, composto pelos anticorpos CD4 (Pacific Blue), CD39 (FITC), CD73 (PE), CD8 (PE-Cy7) e FoxP3 (Alexa Fluor 637).

## **2.7 Análise Estatística**

O teste Shapiro-Wilk será realizado a fim de verificar se há normalidade na distribuição das amostras para cada variável a ser analisada. Para os dados com distribuição normal, foram utilizados testes paramétricos (ANOVA) e para os dados que não seguirem distribuição normal serão utilizados testes não paramétricos (Kruskal-Wallis), adequados ao desenho experimental.

# PARTE III

## DISCUSSÃO

Com raras exceções, a maioria das terapias existentes para o câncer são ineficazes ou transitórias, apesar do amplo conhecimento a respeito de oncogenes e vias de sinalização passíveis de intervenção farmacológica direcionada. Isso se deve, em parte, ao fato que a maioria dos tumores são agregados de diversas células de origem variável e características ambientais, genéticas e epigenéticas distintas (Hanahan and Coussens, 2012). Nesse âmbito, gliomas malignos representam um dos maiores desafios no manejo dos pacientes com câncer em todo o mundo e sua forma mais agressiva, o GB, também é o subtipo mais comum e letal. Apesar de recentes e notáveis descobertas feitas na oncologia, usando técnicas de neuroimagem na ressecção cirúrgica, juntamente com quimioterapia e radioterapia, a sobrevida dos pacientes atinge em média 15 meses a partir do momento do diagnóstico (Stupp *et al.*, 2005, 2009). Esse prognóstico desfavorável está associado ao potencial invasivo e proliferativo que os gliomas possuem, além da resistência ao tratamento e da vasta heterogeneidade inter- e intratumoral.

A heterogeneidade do TME é uma das principais causas relacionadas com a progressão tumoral, metástase, invasão e resistência ao tratamento no câncer (Burrell *et al.*, 2013; Sottoriva *et al.*, 2013; Alizadeh *et al.*, 2015; Gentric, Mieulet and Mechta-Grigoriou, 2017; Patel *et al.*, 2018; Bergmann *et al.*, 2020; Hanahan, 2022). Recentemente, sugere-se que essa heterogeneidade é devida a fatores genéticos, epigenéticos e microambientais, dependendo diretamente de todos os componentes tumorais e não-tumorais que compõem o TME. Além disso, essa diversidade de células encontradas no TME também é capaz de secretar uma série de fatores que impactam na transformação maligna e no desenvolvimento de diferentes fenótipos tumorais. Cada elemento dentro do TME fornece às células neoplásicas um complexo suporte, permitindo que elas proliferem e invadam o tecido adjacente. Assim, a investigação das múltiplas interações entre as células do TME é essencial para compreender os diferentes mecanismos relacionados à progressão tumoral (Balkwill, Capasso and Hagemann, 2012).



Nesse âmbito, o presente estudo tem como principal objetivo explorar a dinâmica interação entre as células do TME em gliomas de grau II, III e IV, avaliando o papel de células tumorais e não-tumorais e investigando as principais diferenças envolvidas nos diferentes graus de glioma e os principais mecanismos imunossupressores envolvidos.

Os gliomas são tumores que se desenvolvem em microambientes extremamente complexos e dinâmicos, os quais influenciam o crescimento e a progressão tumoral. Em resposta às condições ambientais e genéticas, esse microambiente se transforma continuamente, ressaltando sua importância durante o processo de iniciação, progressão e formação de nichos tumorais. Nesse contexto, a comunicação bidirecional entre as células tumorais e seus microambientes adjacentes é crítica tanto para a homeostase do tecido normal quanto para o crescimento tumoral, incluindo (I) contato célula-célula e (II) mediadores desses contatos, como moléculas, fatores e vesículas secretados, responsáveis pela transferência horizontal de informações (Li and Nabet, 2019). Essas interações orquestram a reprogramação em ambientes permissivos ao câncer, impactando no desenvolvimento e progressão tumoral, bem como na resposta ao tratamento (Baghban *et al.*, 2020).

Com populações celulares distintas, o TME do glioma proporciona muitos desafios, incluindo o estresse oxidativo, a privação de nutrientes e a vigilância imunológica. Dessa forma, muitos dos *hallmarks* do câncer estão diretamente relacionados com as diferentes interações que ocorrem no TME, como a capacidade de proliferar e inibir a apoptose, induzir angiogênese, evasão imune e a reprogramação metabólica (Hanahan, 2022; Torrisi *et al.*, 2022). Para superar esses desafios e promover a progressão tumoral, as células tumorais se envolvem num complexo diálogo com as células vizinhas constituintes do TME, por meio do compartilhamento de nutrientes e da simbiose metabólica. Embora o aumento do consumo da glicose seja uma característica do câncer, a plasticidade metabólica também é observada no TME (Ward and Thompson, 2012). Nesse cenário, o capítulo 1 da presente tese teve como

objetivo investigar o papel do metabolismo da glicose e de células linfoides na progressão tumoral do glioma. Primeiramente, foi realizada a análise metabólica de três culturas primárias IDH-Mut (grau II, III e IV) e uma cultura primária IDH-WT (grau IV) derivadas de pacientes, assim como foram analisados os tecidos tumorais *ex vivo*.

Nossos resultados enfatizam o fato que a hipótese de Warburg, de que o aumento da glicólise aeróbica é um efeito da respiração celular prejudicada (Warburg, Wind and Negelein, 1927), não reflete fielmente o metabolismo das células do glioma, uma vez que nossos resultados, relativos à respirometria, indicam a presença de mitocôndrias funcionais. Nesse sentido, observamos que a cultura derivada de um glioma de grau IV IDH-Mut apresenta um grande potencial para a OXPHOS, com a maior respiração basal e máxima entre os graus avaliados (capítulo 1, figura 1C-E). Esse aumento da respiração está acoplado com a síntese de ATP (capítulo 1, figura 1G), indicando um aumento geral da atividade mitocondrial e produção de ATP. É importante ressaltar que não houve diferença na capacidade reserva (capítulo 1, figura 1F), mesmo com a alta respiração máxima da cultura de grau IV IDH-Mut, indicando alterações particulares nos graus avaliados, mas com preservação da função mitocondrial. Esse resultado, associado com a semelhança no nível de vazamento de prótons (capítulo 1, figura 1H), enfatiza a integridade das mitocôndrias dessas células, independente do grau e *status* da mutação de IDH. Ademais, as semelhanças observadas entre os graus II, III e IV IDH-WT sugerem uma menor capacidade fosforilativa, especialmente no grau II. Além disso, os graus III e IV IDH-WT apresentam um aumento de consumo de oxigênio residual (ROX, capítulo 1, figura 1I), refletindo o consumo de O<sub>2</sub> por outros mecanismos não-mitocondriais, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Associado a esses resultados, é notável a semelhança dos graus III e IV IDH-WT em nível de expressão gênica, com superexpressão de todos os genes analisados quando comparados ao grau II (capítulo 1, figura 2), sugerindo que esses graus estejam recorrendo a glicólise, associada em parte com a OXPHOS e, em parte,

com a via das pentoses-fosfato (PPP), proporcionando uma maior síntese de nucleotídeos e favorecendo a sobrevivência e proliferação tumoral (Jiang, Du and Yang, 2013). Além da produção de nucleotídeos, a PPP produz NADPH que pode estar controlando o excesso de ROS para manter a proliferação e invasividade das células sem matá-las. Os níveis alterados de ROX (e, possivelmente, ROS) podem indicar que uma reprogramação metabólica intensa esteja ocorrendo nessas células. À nível de expressão gênica, a cultura primária de grau III e IV IDH-WT apresenta características que sugerem uma boa atividade de fosforilação oxidativa (capítulo 1, figura 2); contudo, por meio da respirometria observamos uma menor produção de ATP associada ao consumo de O<sub>2</sub>. Além disso, o aumento nos níveis de ROX (e, possivelmente, ROS) pode estar relacionado ao fenótipo “ir ou crescer”, no qual as células de grau III podem refletir a transição de um fenótipo altamente proliferativo para um invasivo em um tumor em crescimento (Trachootham, Alexandre and Huang, 2009; Hatzikirou *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2017). Da mesma forma, o ROX aumentado na cultura primária derivada de glioma de grau IV IDH-WT está possivelmente associado a maior capacidade de invasão e fenótipo maligno e pode estar relacionado a uma transição epitelial-mesenquimal (EMT), uma característica de tumores mais agressivos como o GB (Norden, Drappatz and Wen, 2010). Nesse sentido, é importante ressaltar o aumento da expressão dos genes relacionados com o ciclo do TCA e OXPHOS nesses dois graus. Em contrapartida, de uma maneira muito interessante, o grau IV IDH-Mut, que evidencia uma melhor função mitocondrial de acordo com a respirometria, apresenta menor expressão nos genes relacionados com a TCA e OXPHOS. Aqui hipotetizamos dois pontos: (I) estamos avaliando a expressão gênica e não podemos afirmar que esse mRNA está de fato sendo traduzido a proteína, podendo haver alguma modificação pós-transcricional que esteja regulando esse processo; (II) o aumento da OXPHOS observado na respirometria não necessariamente está associado a uma maior expressão de proteínas da cadeia respiratória,

e sim a um fator organizacional da mitocôndria, como mudanças na arquitetura da rede mitocondrial e a formação de supercomplexos (Novack *et al.*, 2020).

Além disso, é importante enfatizar que, apesar da enzima IDH ser tão importante para o ciclo do TCA, a mutação neste gene não parece estar diretamente associada a nenhum dos parâmetros avaliados nas culturas primárias, uma vez que as principais diferenças observadas estão relacionadas ao grau, ao invés da mutação, como ilustrado nas semelhanças entre o grau III (IDH-Mut) e o grau IV (IDH-WT). Nesse sentido, é importante observar que apenas o gene *PKM2* está igualmente expresso nos graus III e IV, independente do *status* de IDH, quando comparado com o grau II (capítulo 1, figura 2B). A superexpressão desse gene chave da glicólise está relacionada com o aumento do aporte de glicose, produção de lactato, inibição da autofagia e, conseqüentemente, progressão tumoral (Alquraishi *et al.*, 2019), além de regular processos como apoptose e migração (Suzuki *et al.*, 2019). Além disso, já foi demonstrado que, quando comparado com tecidos cerebrais normais, os gliomas apresentam alta expressão de *PKM2* (Park *et al.*, 2022), podendo ou não ser grau-dependente (Mukherjee *et al.*, 2013). Nossos resultados sugerem que a superexpressão de *PKM2* pode estar relacionada a processos *drivers* compartilhados por todos os gliomas.

O padrão de expressão gênica observado nos tumores de grau IV IDH-Mut enfatiza a necessidade de discussão sobre as culturas primárias. Nesse âmbito, a utilização da cultura primária de células tumorais em estudos envolvendo rotas metabólicas representa uma interessante estratégia, pois permite elucidar o exato papel dessas células em diversas situações, sem a interferência da diversidade celular presente no TME. Por outro lado, é impossível reproduzir *in vitro* toda a complexidade do TME. Além disso, cabe ressaltar que as condições de cultivo impactam diretamente a diferenciação celular e expressão gênica dessas células (Ledur *et al.*, 2017). Já foi observado que o cultivo de células tumorais na presença de soro, modelo utilizado em nosso trabalho, foi capaz de alterar características epigenéticas e

bioquímicas. Por exemplo, já foi observado que o cultivo celular em soro pode causar a deleção de 18q11-23 (Masters *et al.*, 2001), um *locus* contendo importantes genes relacionados ao metabolismo de lipídios e OXPHOS. Coordenadamente, observa-se que o cultivo em meios sem soro e suplementados com fatores de crescimento (bFGF e EGF) mantém características originais tumorais (Lee *et al.*, 2006; Pollard *et al.*, 2009), bem como apresenta um fenótipo mais oxidativo (Lin *et al.*, 2017), fato que salientamos como uma limitação do nosso trabalho.

Considerando possíveis limitações metodológicas relacionadas com o cultivo em soro e o fato que a reprogramação metabólica envolve todas as células presentes no TME, os principais genes relacionados as vias da glicólise, PPP, ciclo do TCA e OXPHOS também foram analisados a partir do tecido tumoral. Conforme observado na figura 3 do capítulo I, essas análises enfatizaram a heterogeneidade inter- e intratumoral existente no TME, especialmente entre nichos tumorais. Aqui, cabe ressaltar que apesar da heterogeneidade intratumoral ser um conceito frequentemente restrito à presença de diferentes alterações genéticas presentes nas diferentes células tumorais, a verdadeira heterogeneidade excede esse nível. Nesse sentido, é improvável que uma única biópsia represente todas as alterações presentes no tumor e, dessa forma, as amostras podem não ser tão representativas da complexidade do TME. Esse fenômeno já foi observado em gliomas, em que mais de um subtipo molecular foi encontrado em um mesmo tumor. Além disso, já é bem definido que a composição do TME depende da área analisada. Um claro exemplo disso é que no centro do tumor costuma haver focos de hipóxia, enquanto o oxigênio costuma estar amplamente disponível na periferia. Regiões hipóxicas costumam ter uma sinalização completamente diferente daquelas oxigenadas, fornecendo pressão seletiva para células tumorais e imunes.

De uma maneira geral, foi observado um perfil mais glicolítico em amostras tumorais de HGG, com aumento da expressão de genes cruciais, como *HK2* e *PKM2*, que codificam importantes enzimas regulatórias da via glicolítica, com variações de acordo com a mutação de

IDH. O aumento da expressão de ambos genes já foi associado a processos de tumorigênese e invasividade, bem como redução da sobrevida, enfatizando o aumento da agressividade em relação ao LGG (Wolf *et al.*, 2011; Stanke, Wilson and Kidambi, 2021). Apesar desses resultados sugerirem um fenótipo *Warburg-like*, com o aumento dos genes glicolíticos que podem promover glicólise aeróbica, o aumento de *ATP5F1B* em amostras de HGG IDH-Mut demonstra que tanto a via glicolítica quanto a OXPHOS podem contribuir para a produção de ATP nos tumores (Weinberg *et al.*, 2010; Stanke, Wilson and Kidambi, 2021). Nesse sentido, a atividade da ATP sintase já foi correlacionada com mau prognóstico no glioma (Xu and Li, 2016) e em outros cânceres (Yuan *et al.*, 2018; Speransky *et al.*, 2019), correlacionando o aumento da expressão de subunidades da ATP sintase a fenótipos mais invasivos (Huang *et al.*, 2019). Resumidamente, nossos achados relativos às culturas primárias e amostras de tumor sugerem aumento na plasticidade metabólica de LGG para HGG, pois genes relacionados à glicólise, PPP, ciclo do TCA e OXPHOS são aumentados em HGG quando comparados a LGG, sugerindo que o aumento da malignidade está relacionado ao desenvolvimento de diferentes estratégias metabólicas, fornecendo diversas vias para o tumor manter seu estado proliferativo e invasivo. Nesse sentido, o GB é capaz de reprogramar seu perfil metabólico para atender as demandas energéticas relacionadas ao seu alto poder proliferativo (Zhou and Wahl, 2019; Garcia, Jain and Aghi, 2021).

Nesse contexto, os TILs são igualmente dependentes da reprogramação metabólica para adaptação em um microambiente inóspito e promover sobrevivência e proliferação, objetivando a destruição do tumor. Contudo, a interação entre células tumorais e imunes acaba contribuindo para uma mudança do fenótipo antitumoral para um protumoral, com aumento da capacidade supressora das células imunes e/ou com a seleção de células regulatórias que possuem maior capacidade de reprogramação, como, por exemplo, células Treg frente às células T efetoras (Hanahan and Coussens, 2012). Nesse sentido, a avaliação do fenótipo das células imunes

intratumorais no capítulo 1 evidenciou quatro importantes características: 1) a única semelhança entre LGG e HGG é a presença de células T CD8<sup>+</sup> ativadas, essas células podem estar tentando desempenhar funções citotóxicas ou podem estar sendo cronicamente estimuladas, adquirindo um fenótipo de exaustão (capítulo 1, figura 4G); 2) esse fenótipo de exaustão pode estar relacionado com a baixa expressão de CD28 em linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> (Weng, Akbar and Goronzy, 2009), observada em LGG, sugerindo a presença de linfócitos infiltrantes disfuncionais nesse grupo (capítulo 1, figura 4I, J). A redução da porcentagem de células T infiltrantes expressando CD28, quando comparadas com o periférico, em LGG, também pode estar relacionado ao fato da expressão de CD28 estar relacionada com a idade, com redução da sua expressão com o aumento da idade (Effros *et al.*, 1994). Nesse ponto, os pacientes com LGG apresentam uma média de idade menor que os demais grupos, sugerindo uma maior expressão de CD28 periférica ; 3) Apesar da baixa expressão de CD28 intratumoral em LGG, esses tumores parecem ter uma imunidade inata citotóxica mais desenvolvida que os HGG, apresentando uma maior frequência de células NK quando comparadas com as células periféricas (capítulo 1, figura 4F); 4) Além disso, o TME de LGG é, pelo menos em parte, menos imunossuprimido que HGG devido a menor presença de células Treg (capítulo 1, figura 4K). Já foi observado uma relação de aumento da infiltração de Tregs com o grau de glioma (Heimberger *et al.*, 2008; Friebel *et al.*, 2020). A presença de células Treg no TME representa um dos principais mecanismos associados à evasão imune e representa um obstáculo para a imunidade antitumoral e sucesso de imunoterapias (Humphries *et al.*, 2010). Além disso, o aumento de células Treg já foi associado com recidiva tumoral e redução de sobrevida em pacientes com GB (Sayour *et al.*, 2015).

Compreender a composição molecular, celular e bioquímica do TME, bem como as inúmeras interações que ocorrem entre todos os seus componentes, torna-se imperativo, uma vez que gliomas malignos promovem uma série de mecanismos imunomodulatórios que podem

resultar na supressão do sistema imune. Além dos processos clássicos já discutidos no capítulo 1, como a reprogramação metabólica e aumento de células imunes supressoras, inúmeras vias de sinalização estão alteradas no glioma. Nesse sentido, no capítulo 2 desta tese, observamos que os principais componentes da sinalização purinérgica estão alterados no TME de pacientes com glioma, representando um importante mecanismo envolvido na progressão tumoral e evasão imune. No TME, os nucleotídeos e nucleosídeos podem atuar como sinais autócrinos-parácrinos envolvendo um ciclo de retroalimentação com produção e liberação de ATP pelas células tumorais e consequente proliferação celular e crescimento tumoral, promovendo respostas celulares em todos os componentes do TME (Di Virgilio and Adinolfi, 2017; Martínez-Ramírez *et al.*, 2017; Campos-Contreras, Díaz-Muñoz and Vázquez-Cuevas, 2020). Além disso, a sinalização purinérgica atua como um mediador inflamatório, por meio de receptores purinérgicos em células imunes, o eATP atua como um padrão molecular associado ao dano (DAMP), promovendo respostas imunes inatas e adaptativas (Di Virgilio *et al.*, 2018). Esse eATP é progressivamente hidrolisado pelas ectonucleotidasas CD39 e CD73, culminando na formação da ADO. Contrastando as propriedades imunoestimulatórias do eATP, a ADO tem um importante papel imunossupressor, suprimindo células efetoras e estimulando células Tregs, considerada um importante imunomodulador no TME. A ADO também pode ser formada por uma via não-canônica, envolvendo a conversão de  $\text{NAD}^+$  a ADPR pela ectoenzima CD38. Ambas as vias convergem, principalmente, para a CD73, que hidrolisa o AMP a ADO (Dwivedi *et al.*, 2021).

De uma maneira geral, os componentes do TME possuem a maquinaria necessária para produção de ADO e nucleotídeos associados, como ATP, ADP e AMP, contribuindo para a imunossupressão. No GB, a principal via relacionada e estudada é a de imunossupressão pelos Tregs, os quais superexpressam a enzima NTPDase1/CD39 (Mandapathil *et al.*, 2010) que coordenadamente com células de GB, que superexpressam a ecto-5'-nucleotidase/CD73



(Bavaresco et al., 2008), são capazes de produzir a ADO pela hidrólise sequencial do ATP extracelular (Xu et al., 2013). Até o presente momento, entretanto, pouco se sabe sobre a expressão dessas ectoenzimas em células tumorais e imunes de LGG. Neste trabalho, estabelecemos onze culturas primárias derivadas de gliomas de diferentes graus e observamos que, independentemente do grau, as células apresentam o mesmo padrão de expressão das enzimas CD38 (praticamente sem expressão), CD39 (baixa expressão) e CD73 (alta expressão), de uma maneira muito similar com as linhagens imortalizadas encontradas comercialmente. De forma intrigante, as culturas primárias derivadas de gliomas de baixo grau foram capazes de produzir mais ADO, quando incubadas com ATP por 60 minutos (capítulo 2, figura 1), o que nos faz pensar que estamos longe de uma total compreensão do sistema purinérgico nos muitos microambientes dos gliomas.

Nesse sentido, independentemente do grau de glioma, observamos importantes alterações na expressão das ectonucleotidases em todas as subpopulações de TILs quando comparadas com as periféricas (capítulo 2, figura 2), enfatizando a importância dessa via na imunomodulação do TME, favorecendo a produção de ADO. As principais semelhanças observadas entre os LGG e HGG foram relacionadas à via não-canônica, com importante aumento da expressão de CD38<sup>+</sup> em linfócitos B infiltrantes, bem como o aumento da coexpressão de CD38<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> em linfócitos B e T CD8<sup>+</sup> infiltrantes, quando comparada aos periféricos (capítulo 2, figura 4). Esse achado é muito interessante, pois sugere que a via não-canônica se mantém mais conservada no TME entre os diferentes graus de glioma, sugerindo que o aumento da CD38 possa ser uma consequência da ativação imune presente no TME. Além disso, é importante ressaltar a relevância desse aumento da CD38 nas células linfóides do TME, uma vez que ela está associada à redução da atividade efetora de células T pela atividade de células Treg (Patton *et al.*, 2011; Bahri *et al.*, 2012) e Breg (Blair *et al.*, 2010; Bouaziz *et al.*, 2012; Figueiró *et al.*, 2016), promovendo evasão imune e progressão tumoral. Além disso, a

baixa expressão de CD38 nas células tumorais é contraposta com a alta expressão nas células imunes, favorecendo a produção de ADO por meio da via não-canônica.

Em contrapartida, a única similaridade observada entre os TIL de pacientes com LGG e HGG relacionada à via canônica é o aumento da expressão de CD39 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> (capítulo 2, figura 3). Essa população, diretamente associada com a expressão de FoxP3 (Borsellino *et al.*, 2007), está relacionada a uma potente ação imunossupressora em diversos tipos de câncer (Borsellino *et al.*, 2007; Takenaka, Robson and Quintana, 2016; Timperi *et al.*, 2016), em parte devido à alta produção de ADO decorrente (Deaglio *et al.*, 2007). Nesse âmbito, sugere-se que a imunossupressão mediada por essa população aja de maneira similar tanto em LGG quanto em HGG. É importante ressaltar que no capítulo I foi observado um aumento de células Treg CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> apenas nos HGG, sugerindo que apesar de CD39 estar associado à atividade supressora e à expressão de FoxP3, células T CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> podem expressar mais mecanismos associados a supressão. Nesse sentido, a expressão do fator de transcrição FoxP3 é essencial para garantir a função supressora das Tregs (Fontenot, Gavin and Rudensky, 2003; Deng *et al.*, 2019). Além disso, corroborando com nossos resultados, já foi observado que a população CD4<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> podem apresentar dois fenótipos diferentes: um FoxP3<sup>+</sup>, associado diretamente com funções supressoras, e outro FoxP3<sup>-</sup>, associado com um fenótipo de memória e sem funções supressoras (Zhou *et al.*, 2009; Schuler *et al.*, 2011).

A via canônica revela importantes diferenças imunes entre pacientes com LGG e HGG em linfócitos B e T CD8<sup>+</sup>, bem como em células NK (capítulo 2, figura 3). Um dos principais achados do capítulo 2 é justamente relativo ao aumento da expressão da população CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> intratumoral apenas em LGG. Diversos estudos já associaram essa população a exaustão de células T (Yang *et al.*, 2019; Qi *et al.*, 2020), sendo relacionada a redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento de checkpoints imunes, como PD-1 e TIM-3 (Qi *et al.*, 2020). Acredita-se que esse achado esteja relacionado com o fato que, em pacientes com LGG, os linfócitos T

citotóxicos se encontram continuamente ativados na tentativa de eliminar as células tumorais e, devido a esse estímulo crônico acabam entrando em processo de exaustão. Ao encontro a esses achados, no capítulo 1, foi observado uma redução da expressão de CD28 em células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes apenas em LGG. Estudos já associaram esse fenótipo à estimulação crônica a antígenos tumorais (Weng, Akbar and Goronzy, 2009; Schietinger *et al.*, 2016), a qual é uma das principais causas de exaustão de células T (Schietinger *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que o TME de gliomas apresentam altos níveis de antígenos tumorais (Mirzaei, Sarkar and Yong, 2017; Davidson *et al.*, 2019; McLane, Abdel-Hakeem and Wherry, 2019). Dessa forma, propõem-se que a exposição persistente a antígenos tumorais, bem como a ativação crônica de células T CD8<sup>+</sup>, favoreçam a promoção de um fenótipo exausto/disfuncional de células T CD8<sup>+</sup> em pacientes com LGG, que tendem a ter uma progressão mais lenta da doença. Em contrapartida, apenas no HGG foi observado o aumento da expressão de CD73 em células NK. Recentemente, este fenótipo foi associado a uma capacidade imunossupressora das NKs, com aumento da produção de IL-10 e ADO (Neo *et al.*, 2020; Coy *et al.*, 2022). A via canônica, dessa forma, parece atuar de diferentes formas dependendo do grau do glioma, promovendo imunossupressão, muitas vezes associadas com o estímulo à formação de ADO.

A ADO formada pelas vias canônica e não-canônica pode atuar sobre as células por meio dos receptores P1. A expressão gênica nos tecidos tumorais revelou alguns dados contrastantes com a literatura a respeito dos receptores P1, com maior expressão de A1 e A2A em LGG (capítulo 2, figura 5). Há escassas informações a respeito dos receptores P1 em LGG, porém Huang *et al.* (2016), observou uma menor expressão de ambos receptores em gliomas de grau I e II em comparação aos graus III e IV (Huang *et al.*, 2016). Além disso, em contrapartida, observamos que LGG apresentam maior expressão de CD38 e da *NTPDase3* que os HGG. A maior expressão de CD38 em estágios iniciais tumorais já foi observada em outros tumores, como o colorretal (Perenkov *et al.*, 2012), próstata (Chmielewski *et al.*, 2018) e de

ovário (Zhu *et al.*, 2020). Além disso, por análises *in silico* observamos que a maior expressão de *CD38* está correlacionada com melhor prognóstico. A maior expressão da *NTPDase3* em LGG corrobora com trabalhos anteriores do grupo (Rockenbach *et al.*, 2014), em que estágios iniciais do câncer de bexiga expressam mais esse gene.

De uma maneira geral, os resultados obtidos relativos à sinalização purinérgica sugerem um aumento das ectoenzimas *CD38*, *CD39* e *CD73* nas células imunes infiltrantes em LGG e, especialmente, HGG. Isso pode contribuir para o pior prognóstico de pacientes com HGG, apesar de não correlacionarmos esse aumento da expressão com menor sobrevida nas análises *in silico*, sugerindo que essas alterações per se podem não ser suficientes para imunossuprimir o sistema imunológico e sim uma complexa cascata de interações entre todas as células TME trabalhando sinergicamente é necessária para promover a imunossupressão. Dessa maneira, diferentes células do TME podem expressar simultaneamente diferentes ectoenzimas, capazes de metabolizar diferentes nucleotídeos, agindo de maneira descontínua de acordo com a proximidade e abundância de células do TME. Os resultados da via não-canônica trazem informações inéditas e relevantes em relação ao TME de LGG e o desenvolvimento de um TME imunossupressor no contexto do glioma.

Além disso, os resultados obtidos nos capítulos 1 e 2 fornecem um exemplo compreensível de como uma única mutação na via pode alterar todo o TME, reforçando a importância do *status* de *IDH* na biologia celular do glioma. Nesse âmbito, uma questão bastante inexplorada no contexto do TME é como ele pode ser modulado por mutações oncogênicas nas células tumorais e como isso pode afetar na heterogeneidade intratumoral. Mutações nas enzimas relacionadas a TCA são muito comuns em diversos cânceres. Em especial, a mutação em *IDH* está presente na maioria dos LGG e em alguns HGG, principalmente nos secundários. Cabe ressaltar aqui um ponto muito importante observado nesse trabalho: durante dois anos de coleta, foram recebidas 39 amostras de gliomas de

diferentes graus. Dessas, 26 foram diagnosticadas como astrocitomas de grau IV primários, sendo 16 IDH-WT e 10 IDH-Mut, representando cerca de 60% e 40%, respectivamente. Essa frequência é muito diferente das reportadas na literatura, que estabelecem cerca de apenas 5 - 14 % de astrocitomas de grau IV primários com a mutação em *IDH* (Parsons *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2009; Ichimura *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009). Um estudo observou que pacientes com diagnóstico primário de grau IV IDH-Mut apresentavam características moleculares condizentes com tumores secundários, sugerindo que, muitas vezes, os gliomas podem ter se originado de um grau mais baixo e progredido rapidamente (Nobusawa *et al.*, 2009). Essa pode ser uma justificativa do porquê as incidências de IDH-Mut sejam tão altas em nossa coorte.

Quando mutada, a enzima catalisa a conversão do  $\alpha$ KG a 2HG, reduzindo a disponibilidade de  $\alpha$ KG e NADPH, e favorecendo o acúmulo do oncometabólico 2HG. Esse acúmulo já foi associado a alteração de diversas vias de sinalização e alterações epigenéticas, como a formação de um fenótipo metilador que favorece a transformação maligna (Ichimura, 2012), além de promover a imunossupressão e evasão imune (Kohanbash *et al.*, 2017; Bunse *et al.*, 2018; Notarangelo *et al.*, 2022). Entretanto, a presença da mutação em IDH está associada a uma melhor sobrevida e resposta ao tratamento em pacientes com glioma (Bleeker *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Molenaar *et al.*, 2015, 2018). Apesar dos mecanismos associados com a melhor resposta ao tratamento não estarem elucidados, estudos sugerem que a consequente redução dos níveis de NADPH em células IDH-Mut aumente a produção de ROS, e isso está associado a um aumento da sensibilidade à radio e quimioterapia em células IDH-Mut (Bleeker *et al.*, 2010; Tateishi *et al.*, 2015; Wahl *et al.*, 2017). Esse mecanismo também justificaria, pelo menos em parte, o fato que em leucemias a mutação em IDH estar associada a um pior prognóstico, pois em células mieloides, a G6PD é o maior gerador de NADPH ao invés da IDH (Molenaar *et al.*, 2014; Stuani, Sabatier and Sarry, 2019).

Considerando apenas gliomas de grau IV, nossos resultados evidenciaram algumas diferenças entre os tumores IDH-Mut e IDH-WT, como na expressão gênica da *ENTPDI* e *NT5E*, expressas em maiores níveis nas amostras IDH-Mut. Diferentemente de muitos estudos, que sugerem que a mutação de IDH favorece um TME mais imunossuprimido, com menos linfócitos infiltrantes e menor atividade citotóxica (Berghoff *et al.*, 2017; Kohanbash *et al.*, 2017; Bunse *et al.*, 2018; Klemm *et al.*, 2020; Notarangelo *et al.*, 2022), não observamos nenhuma diferença em relação a presença de TILs entre amostras IDH-Mut e -WT. Metabolicamente, as culturas primárias IDH-Mut apresentam grande potencial para a OXPHOS, enquanto as IDH-WT parecem depender mais da glicólise e ter potencial para geração de mais ROS. Em relação a isso, sugere-se que a ausência de uma respiração mitocondrial tão potente nas células IDH-WT pode tornar mais difícil de encontrar alvos terapêuticos, enquanto na IDH-Mut pode ser interessante procurar alvos que foquem no metabolismo, especialmente na OXPHOS. Nesse âmbito, um ensaio clínico utilizou metformina e cloroquina em pacientes com tumores sólidos IDH-Mut; contudo, não foi observado melhora clínica (Khurshed *et al.*, 2021).

Além do *status* de IDH, p53 é um dos principais marcadores moleculares avaliados em pacientes com glioma. Esse supressor tumoral tem um papel variado no glioma, sendo crucial na progressão tumoral, atuando como um potente regulador metabólico no TME (Wanka *et al.*, 2012). Nossos resultados, em concordância com outros (Guo and Cui, 2015; Kasthuber and Lowe, 2017), destacam que os tumores com alta expressão de p53 favorecem a glicólise e, assim, promovem imunossupressão pelo aumento das células Treg (Kishore *et al.*, 2017; Pacella *et al.*, 2018). Em contrapartida, tumores com baixa expressão de p53 apresentam uma maior expressão de *TIGAR* e *G6PD*, direcionando o metabolismo da glicose para o ramo oxidativo do PPP. Isso favorece a produção de NADPH, glutatona e ribose-5-fosfato, levando à neutralização dos níveis intracelulares de ROS, diminuindo a morte celular induzida por ROS

e apoiando a síntese de DNA no glioma (Kumar *et al.*, 2015). Coletivamente, nossos resultados sugerem que a reprogramação metabólica e a evasão imune estão em associados com as mutações *driver* e a progressão do câncer.

Ao longo desta tese, foram abordados importantes exemplos de sinalização celular presentes TME, enfatizando a importância desses mecanismos como um meio chave na comunicação intercelular entre os diferentes componentes do TME. No capítulo 3 desta tese, exploramos um modo emergente e promissor de comunicação/sinalização celular que destaca a complexidade das interações que compõem o TME: as EVs. Essas vesículas são importantes moduladores do TME, pois funcionam como veículos de transferência de informações, facilitando o transporte de mensageiros que impactam a iniciação e progressão tumoral. No contexto do câncer, EVs derivadas de tumores (TEVs) são importantes mediadores de informações malignas entre células tumorais parentais ou não-tumorais. Embora os mecanismos de processamento e entrega das TEVs ainda não sejam completamente elucidados, acredita-se que há o envolvimento de ligação com receptores na superfície celular, podendo ser seguido de endocitose ou fagocitose, fornecendo material genético e proteínas que podem reprogramar a célula receptora (Mirzaei, Sarkar and Yong, 2017). Em 2007, Valadi *et al.* foi o primeiro a observar que a transferência de mRNA e microRNAs por EVs de uma célula para outra modulou funções celulares na célula destinatária (Valadi *et al.*, 2007). Atualmente, há incontáveis trabalhos buscando elucidar os papéis que as TEVs desempenham na progressão tumoral, em especial na capacidade dessas vesículas em modular o sistema imune.

O capítulo 3 desta tese inicia com um artigo de revisão que explora o papel dual das TEVs na progressão tumoral e modulação do sistema imune. TEVs são capazes de interagir e modular linfócitos por meio de moléculas imunossupressoras ou estimulatórias carregadas. O conteúdo das TEVs é altamente dependente de variáveis como o sistema imune do hospedeiro e o tipo e estadiamento do câncer, bem como todas as interações que ocorrem no TME. De uma

maneira geral, o papel antitumoral das TEVs está pautado no fato que elas são fontes de antígenos tumorais (Wolfers *et al.*, 2001), apresentando potencial para vacinas (Raposo, 1996; Zitvogel *et al.*, 1998), e promoção de uma eficiente apresentação de antígenos nas células apresentadoras de antígenos (Wolfers *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2016), estimulando uma resposta imune efetora antitumoral robusta. Além disso, já foi observado que TEVs podem carrear DAMPs, como proteínas de choque térmico (HSP), que também são capazes de estimular a resposta imune contra o tumor (Gastpar *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2009; Yufeng Xie *et al.*, 2010). Nesse contexto, o artigo 2 do terceiro capítulo da tese propõe dois modelos de glioma murino utilizando GEVs como forma de tratamento. No primeiro modelo proposto, as GEVs são coinjectadas junto com as células tumorais, no momento do implante tumoral. Já no segundo modelo, os animais foram tratados com as GEVs, via intranasal, 10 e 5 dias antes do implante das células tumorais. Em ambos os modelos, foi observada uma redução do volume tumoral dos animais tratados com as GEVs em comparação aos controles. Essa redução do volume tumoral foi associada a uma redução da capacidade proliferativa, com redução de Ki67 nos tumores tratados com as GEVs, em ambos os modelos, e redução da atividade supressora com a redução de células FoxP3<sup>+</sup>. De uma maneira muito interessante, o momento e local de inoculação das GEVs parece influenciar diretamente a composição do TME dos animais, uma vez que o grupo coinjeção apresentou uma importante modulação imune, com redução de células T CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, diferentemente do grupo intranasal. Nossos resultados *in vivo* enfatizam o papel antitumoral das GEVs, ressaltando sua capacidade em modular o sistema imune. Outros trabalhos demonstraram a atividade antitumoral de TEVs em modelos de vacinas (Larry A Harshyne *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2022; Thakur *et al.*, 2022), sugerindo que as TEVs são importantes fontes de antígenos associados ao tumor e que a presença delas em fases iniciais da progressão tumoral pode estimular a imunidade antitumoral. Nesse sentido, acredita-se que células dendríticas são



capazes de responder às TEVs contendo antígenos tumorais e DAMPs. Nos linfonodos, esses antígenos tumorais são apresentados às MHC de classe I e podem ativar células T CD8<sup>+</sup>, a qual migra para o tumor. No tumor, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem identificar as células tumorais de acordo com os antígenos tumorais apresentados, eliminando-as (Hiam-Galvez, Allen and Spitzer, 2021). É importante enfatizar que esse processo de ativação imune pode ser prejudicado em muitos tumores devido à complexidade de interações presentes no TME, resultando numa resposta imune efetora ineficaz, promovendo a progressão tumoral.

Nesse sentido, há uma série de relatos na literatura associando TEVs a mecanismos imunossupressores, tais como atenuação da resposta imune efetora (Ning *et al.*, 2018; M. Wang *et al.*, 2020), indução da exaustão de células T (J. Wang *et al.*, 2020), ativação e expansão de Tregs (Wieckowski *et al.*, 2009; Beccard *et al.*, 2020; Shao *et al.*, 2020). Na terceira parte do capítulo 3 desta tese, investigamos a capacidade de imunomodulação das GEVs. Para isso, estabelecemos culturas primárias derivadas de quatro gliomas de diferentes graus (grau II, grau III, grau IV IDH-Mut e grau IV IDH-WT) e isolamos as GEVs presentes no sobrenadante das culturas, de acordo com o protocolo estabelecido no artigo 2 do capítulo 3 desta tese. O primeiro ponto a se ressaltar aqui é que as culturas derivadas de diferentes graus foram capazes de produzir diferentes quantidades de EVs (Figura 1C, capítulo 3, resultados preliminares). A cultura derivada de um glioma de grau III foi capaz de produzir o dobro de EVs em comparação às demais culturas analisadas. De uma maneira muito interessante, foi observado no capítulo 1 que essas mesmas células parecem estar sofrendo uma reprogramação metabólica intensa, apresentando alto potencial de produção de ROS e a maior expressão de genes relacionados com a glicólise e PPP (Capítulo 1, Figuras 1 e 2). Já se sabe que células que estão sob estresse aumentam a produção de EVs (Ludwig *et al.*, 2020), e processos como estresse oxidativo (Atienzar-Aroca *et al.*, 2016), hipóxia (Gonzalez-King *et al.*, 2017), acidificação do TME (Logozzi *et al.*, 2019), privação de glicose (Garcia *et al.*, 2015) e a inibição da glicólise e

OXPHOS (Ludwig *et al.*, 2020) já foram associados com aumento da secreção de EVs. Dessa forma, os dados obtidos nos capítulos 1 e 3 dessa tese parecem concordar com o fato que o aumento da atividade metabólica das células promove maior produção de EVs.

Após a caracterização das GEVs, elas foram coincubadas com PBMCs previamente ativadas por 48 horas. Primeiramente, foi observado que as GEVs são internalizadas, em baixos níveis, por células T, sendo observada uma maior capacidade das células T CD8<sup>+</sup> em internalizar as GEVs quando comparadas com as células T CD4<sup>+</sup>. Em geral, células fagocíticas internalizam mais as EVs, assim como células B e NKs (Muller *et al.*, 2017); contudo, a imunomodulação pelas TEVs não é dependente da internalização e a transferência de informações pode ocorrer por meio de ligação a receptores (Hao *et al.*, 2021). Nós observamos que as GEVs não foram capazes de alterar o estado de ativação dos linfócitos T de acordo com a expressão de CD25 e CD69 (Capítulo 3, Figura 3A, B, resultados preliminares), diferentemente de outros (Hellwinkel *et al.*, 2015; Muller *et al.*, 2017; Azambuja *et al.*, 2020; Ricklefs *et al.*, 2023). Em contrapartida, as GEVs foram capazes de aumentar a expressão dos checkpoints imunes CTLA4 e PD-1, sugerindo a perda da função efetora das células T devido a promoção de um estado de exaustão, principalmente em células T CD4<sup>+</sup> (Capítulo 3, Figura 3C, D, resultados preliminares). Além disso, as GEVs foram capazes de induzir apoptose de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Capítulo 3, Figura 3E, resultados preliminares), porém incapazes de ativar e expandir Tregs, de maneira similar ao observado em outros trabalhos (Azambuja *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2022). Esses resultados enfatizam o papel imunossupressor das GEVs no TME, promovendo processos de exaustão e morte de células T e facilitando processos de evasão imune. De uma maneira muito interessante, os efeitos imunossupressores das GEVs parecem ser dependentes do grau tumoral, uma vez que o aumento de checkpoints imunes não foi observado em linfócitos coincubados com EVs derivadas de glioma de grau II, sugerindo que

EVs derivadas de tipos tumorais menos agressivos possuem uma menor capacidade imunossupressora.

De uma maneira conjunta, o capítulo 3 desta tese avaliou os diferentes potenciais imunomodulatórios das GEVs, enfatizando o papel dual que elas podem desempenhar dependendo do contexto e do momento que estão inseridas. Aqui, propõe-se uma interessante relação entre o efeito imunomodulatório desempenhado pelas TEVs e as diferentes fases de imunoeedição tumoral (Najaflou *et al.*, 2022). O conceito de imunoeedição surgiu como uma forma de ampliar a hipótese de vigilância imunológica adotando uma visão mais ampla das interações entre o sistema imune e o tumor. Com ele, reconheceu-se o papel dual do sistema imune frente ao tumor, sugerindo que ele não somente combateria o tumor, mas participaria do processo de evasão tumoral, exercendo uma pressão seletiva nos tumores dependendo da fase de tumorigênese (Dunn *et al.*, 2002). Resumidamente, o processo de imunoeedição é dividido em três fases: eliminação, equilíbrio e escape. Na eliminação, pequenos tumores podem ser reconhecidos e eliminados pelo sistema imune. No equilíbrio, os tumores podem ser controlados pela pressão imunológica, porém não são eliminados. Em geral, nessas duas primeiras fases os tumores não são clinicamente detectáveis. Por fim, a fase de escape representa a evasão das células imunes, com predomínio de atividade imunossupressora. Nesse âmbito, hipotetiza-se que as GEVs são capazes de atuar em todas essas fases da imunoeedição, com mudanças significativas no seu conteúdo, promovendo ativação imunológica contra o tumor nos estágios iniciais (como observado em nossos modelos murinos), e imunossupressão e auxílio na evasão imune na fase de escape, dependendo diretamente dos diferentes processos e condições que o TME sofre. Dessa forma, estratégias terapêuticas relacionadas às GEVs podem envolver inibição da produção de TEVs em tumores desenvolvidos (Datta *et al.*, 2017; Catalano and O’Driscoll, 2020), bem como o estímulo da formação de fatores imunoestimulatórios nas TEVs (Chen *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2020), além da aplicabilidade em

vacinas (Gu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) e como carreadores de moléculas (Yang *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2020).

## CONCLUSÃO

Nessa tese, avaliamos diferentes estratégias desenvolvidas pelo glioma que modulam o microambiente tumoral e favorecem à progressão tumoral. Foi observado que distintas populações celulares do microambiente tumoral são capazes de estabelecer uma complexa rede de interações e sinalizações célula-célula, favorecendo mecanismos de supressão, como a promoção da evasão imune por meio de células regulatórias e moléculas imunossupressoras, e a reprogramação metabólica. No âmbito da reprogramação metabólica, observou-se a importância do status de IDH na progressão tumoral. Nossos resultados enfatizaram as diferentes estratégias imunes e metabólicas desenvolvidas pelos diferentes graus de glioma, enfatizando um aumento do perfil imunossupressor em gliomas de alto grau.

### *Conclusões específicas*

#### Capítulo 1:

- Independentemente do grau avaliado, as culturas primárias apresentam mitocôndrias saudáveis, de acordo com experimentos de respirometria; contudo, as culturas primárias derivadas de gliomas de grau IV, com mutação em IDH, apresentam um maior potencial de fosforilação oxidativa;
- Gliomas de grau IV apresentam uma maior infiltração de células T regulatórias, favorecendo a imunossupressão do microambiente tumoral;
- A superexpressão de p53 foi associada com funções imunossupressoras e alterações no metabolismo energético em gliomas de grau IV.

#### Capítulo 2:

- Há uma importante modulação das ectoenzimas da via canônica e não-canônica no microambiente tumoral, com aumento da expressão em linfócitos infiltrantes tumorais quando

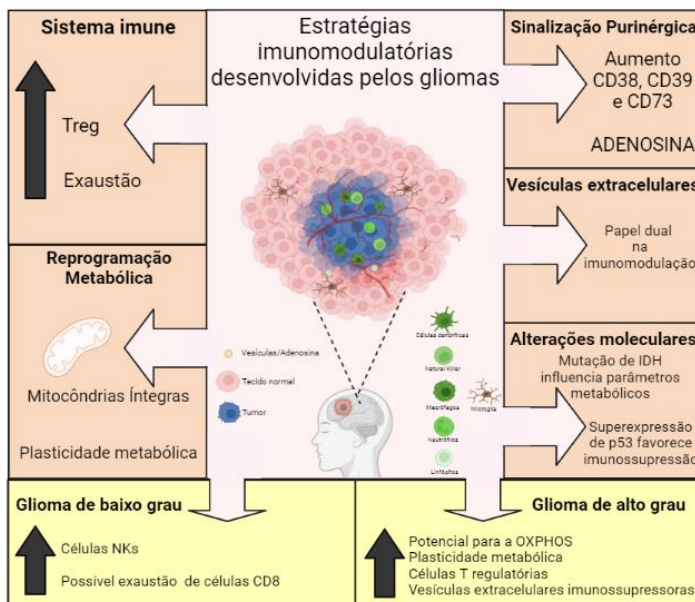
comparadas ao sangue periférico. Esse aumento favorece a geração de adenosina, uma importante molécula imunossupressora.

Capítulo 3:

- As vesículas extracelulares podem desempenhar papéis anti- e protumorais dependendo do contexto em que se inserem. Em fases iniciais da tumorigênese, elas podem funcionar como importantes fontes de antígenos associados ao tumor, estimulando a imunidade antitumoral;

- As vesículas extracelulares expressam CD39 e CD73 e são capazes de produzir adenosina, favorecendo a imunossupressão do microambiente. Além disso, elas são capazes de imunomodular os linfócitos T, favorecendo um fenótipo imunossupressor e de exaustão, de uma maneira grau-dependente, enfatizando os diferentes mecanismos utilizados pelas células tumorais na progressão tumoral;

**Figura 3:** As diferentes estratégias desenvolvidas pelo glioma que modulam o microambiente tumoral e favorecem a progressão tumoral



**Figura 3:** A imagem sumariza as diferentes estratégias desenvolvidas pelo glioma que modulam o microambiente tumoral e favorecem a progressão tumoral. Distintas populações celulares do microambiente tumoral são capazes de estabelecer uma complexa rede de interações e sinalizações célula-célula, favorecendo mecanismos de supressão, como a promoção da evasão imune por meio de células regulatórias e moléculas imunossupressoras, e a reprogramação metabólica.

## **PERSPECTIVAS**

- Aumentar o N amostral, avaliando os linfócitos infiltrantes tumorais e os genes metabólicos nos diferentes graus de glioma (II, III e IV) e não somente em LGG e HGG, permitindo elucidar mais diferenças entre os grupos;
- Avaliar PBMCs de indivíduos saudáveis e comparar com as PBMCs de pacientes com glioma, bem como com os linfócitos infiltrantes;
- Analisar a expressão da lactato desidrogenase (LDH) para elucidar melhor o perfil glicolítico os genes analisados;
- Avaliar o metabolismo das subpopulações de linfócitos infiltrantes tumorais por meio de sondas metabólicas (2-NBDG, bodipy e mitostatus), respirometria e expressão gênica, aprofundando no imunometabolismo dos diferentes graus de glioma;
- Avaliar o fenótipo de células T CD8<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> quanto a marcadores de exaustão (PD-1, CTLA4 e TIM-3), imunofenotipando linfócitos infiltrantes tumorais e realizando experimentos de cocultura;
- Avaliar o papel imunomodulatório das vesículas extracelulares derivadas do plasma dos pacientes com graus de glioma.



## REFERÊNCIAS

- Alizadeh, A. A. *et al.* (2015) 'Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity', *Nature Medicine*, 21(8), pp. 846–853. doi: 10.1038/nm.3915.
- Allison, K. E., Coomber, B. L. and Bridle, B. W. (2017) 'Metabolic reprogramming in the tumour microenvironment: a hallmark shared by cancer cells and T lymphocytes', *Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 152(2), pp. 175–184. doi: <https://doi.org/10.1111/imm.12777>.
- Alquraishi, M. *et al.* (2019) 'Pyruvate kinase M2: A simple molecule with complex functions.', *Free radical biology & medicine*. United States, 143, pp. 176–192. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.007.
- Amary, M. F. *et al.* (2011) 'IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours.', *The Journal of pathology*. England, 224(3), pp. 334–343. doi: 10.1002/path.2913.
- Anand, P. K. (2010) 'Exosomal membrane molecules are potent immune response modulators', *Communicative and Integrative Biology*, 3(5), pp. 405–408. doi: 10.4161/cib.3.5.12474.
- Antonioli, L. *et al.* (2013) 'Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 13(12), pp. 842–857. doi: 10.1038/nrc3613.
- Atienzar-Aroca, S. *et al.* (2016) 'Oxidative stress in retinal pigment epithelium cells increases exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells.', *Journal of cellular and molecular medicine*. England, 20(8), pp. 1457–1466. doi: 10.1111/jcmm.12834.
- Azambuja, J. H. *et al.* (2020) 'Molecular profiles and immunomodulatory activities of glioblastoma-derived exosomes', *Neuro-Oncology Advances*. doi: 10.1093/noajnl/vdaa056.
- Badur, M. G. *et al.* (2018) 'Oncogenic R132 IDH1 Mutations Limit NADPH for De Novo Lipogenesis through (D)2-Hydroxyglutarate Production in Fibrosarcoma Sells.', *Cell reports*. United States, 25(4), pp. 1018-1026.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.074.
- Baghban, R. *et al.* (2020) 'Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance', *Cell Communication and Signaling*, 18(1), p. 59. doi: 10.1186/s12964-020-0530-4.
- Bahri, R. *et al.* (2012) 'Ectonucleotidase CD38 demarcates regulatory, memory-like CD8+ T cells with IFN- $\gamma$ -mediated suppressor activities.', *PloS one*, 7(9), p. e45234. doi: 10.1371/journal.pone.0045234.

- Balkwill, F. (2004) 'CANCER AND THE CHEMOKINE NETWORK', *Nature Reviews*, 4, pp. 540–550. doi: 10.1038/nrc1388.
- Balkwill, F. R., Capasso, M. and Hagemann, T. (2012) 'The tumor microenvironment at a glance.', *Journal of cell science*. England, 125(Pt 23), pp. 5591–5596. doi: 10.1242/jcs.116392.
- Bassett, A. R. *et al.* (2008) 'The Chromatin Remodelling Factor dATRX Is Involved in Heterochromatin Formation', *PLOS ONE*. Public Library of Science, 3(5), p. e2099. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002099>.
- Bastid, J. *et al.* (2013) 'ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 32(14), pp. 1743–1751. doi: 10.1038/onc.2012.269.
- Bavaresco, L. *et al.* (2008) 'The role of ecto-5'nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 319(1–2), pp. 61–68. doi: 10.1007/s11010-008-9877-3.
- Beccard, I. J. *et al.* (2020) 'Immune Suppressive Effects of Plasma-Derived Exosome Populations in Head and Neck Cancer.', *Cancers*. Switzerland, 12(7). doi: 10.3390/cancers12071997.
- Berghoff, A. S. *et al.* (2017) 'Correlation of immune phenotype with IDH mutation in diffuse glioma.', *Neuro-oncology*. England, 19(11), pp. 1460–1468. doi: 10.1093/neuonc/nox054.
- Bergmann, N. *et al.* (2020) 'The Intratumoral Heterogeneity Reflects the Intertumoral Subtypes of Glioblastoma Multiforme: A Regional Immunohistochemistry Analysis.', *Frontiers in oncology*. Switzerland, 10, p. 494. doi: 10.3389/fonc.2020.00494.
- Bettinger, I., Thanos, S. and Paulus, W. (2002) 'Microglia promote glioma migration.', *Acta neuropathologica*. Germany, 103(4), pp. 351–355. doi: 10.1007/s00401-001-0472-x.
- Biegging, K. T., Mello, S. S. and Attardi, L. D. (2014) 'Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression.', *Nature reviews. Cancer*. England, 14(5), pp. 359–370. doi: 10.1038/nrc3711.
- Blair, P. A. *et al.* (2010) 'CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients.', *Immunity*. United States, 32(1), pp. 129–140. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009.
- Bleeker, F. E. *et al.* (2010) 'The prognostic IDH1R132mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma', *Acta Neuropathologica*, 119(4), pp. 487–

494. doi: 10.1007/s00401-010-0645-6.

Borsellino, G. *et al.* (2007) 'Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression', *Blood*, 110(4), pp. 1225–1232. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>.

Borsellino, G. *et al.* (2016) 'Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3', *Blood*, 110(4), pp. 1225–1233. doi: 10.1182/blood-2006-12-064527.The.

Bouaziz, J.-D. *et al.* (2012) 'IL-10 producing regulatory B cells in mice and humans: state of the art.', *Current molecular medicine*. Netherlands, 12(5), pp. 519–527. doi: 10.2174/156652412800620057.

Bours, M. J. L. *et al.* (2006) 'Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation', *Pharmacology and Therapeutics*, 112(2), pp. 358–404. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.04.013.

Bowman, R. L. and Joyce, J. A. (2014) 'Therapeutic targeting of tumor-associated macrophages and microglia in glioblastoma.', *Immunotherapy*. England, pp. 663–666. doi: 10.2217/imt.14.48.

Bruno, A. *et al.* (2014) 'Orchestration of angiogenesis by immune cells', *Frontiers in Oncology*. doi: 10.3389/fonc.2014.00131.

Bu, N. *et al.* (2015) 'Exosomes from Dendritic Cells Loaded with Chaperone-Rich Cell Lysates Elicit a Potent T Cell Immune Response Against Intracranial Glioma in Mice', *Journal of Molecular Neuroscience*, 56(3), pp. 631–643. doi: 10.1007/s12031-015-0506-9.

Budhu, S. *et al.* (2017) 'Blockade of surface-bound TGF- $\beta$  on regulatory T cells abrogates suppression of effector T cell function in the tumor microenvironment.', *Science signaling*. United States, 10(494). doi: 10.1126/scisignal.aak9702.

Bunse, L. *et al.* (2018) 'Suppression of antitumor T cell immunity by the oncometabolite (R)-2-hydroxyglutarate', *Nature Medicine*, 24(8), pp. 1192–1203. doi: 10.1038/s41591-018-0095-6.

Burrell, R. A. *et al.* (2013) 'The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution', *Nature*, 501(7467), pp. 338–345. doi: 10.1038/nature12625.

Campos-Contreras, A. D. R., Díaz-Muñoz, M. and Vázquez-Cuevas, F. G. (2020) 'Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer.', *Cells*. Switzerland, 9(7). doi: 10.3390/cells9071612.

- Carbonneau, M. *et al.* (2016) 'The oncometabolite 2-hydroxyglutarate activates the mTOR signalling pathway.', *Nature communications*, 7, p. 12700. doi: 10.1038/ncomms12700.
- Casano, A. M. and Peri, F. (2015) 'Microglia: multitasking specialists of the brain.', *Developmental cell*. United States, 32(4), pp. 469–477. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.018.
- Catalano, M. and O'Driscoll, L. (2020) 'Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors.', *Journal of extracellular vesicles*. United States, 9(1), p. 1703244. doi: 10.1080/20013078.2019.1703244.
- Cekic, C. and Linden, J. (2016) 'Purinergic regulation of the immune system', *Nature Reviews Immunology*. doi: 10.1038/nri.2016.4.
- Chen, W. *et al.* (2006) 'Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells', *European Journal of Immunology*. doi: 10.1002/eji.200535501.
- Cheng, L. *et al.* (2011) 'Elevated Invasive Potential of Glioblastoma Stem Cells', *Biochemical and Biophysical Acta*, 406(4), pp. 643–648. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.123.Elevated.
- Chiang, S. *et al.* (2016) 'IDH2 Mutations Define a Unique Subtype of Breast Cancer with Altered Nuclear Polarity.', *Cancer research*. United States, 76(24), pp. 7118–7129. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0298.
- Chmielewski, J. P. *et al.* (2018) 'CD38 Inhibits Prostate Cancer Metabolism and Proliferation by Reducing Cellular NAD(+) Pools.', *Molecular cancer research : MCR*, 16(11), pp. 1687–1700. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0526.
- Cho, J. *et al.* (2009) 'MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models.', *Cancer letters*. Ireland, 275(2), pp. 256–265. doi: 10.1016/j.canlet.2008.10.021.
- Clayton, A. *et al.* (2011) 'Cancer Exosomes Express CD39 and CD73, Which Suppress T Cells through Adenosine Production', *The Journal of Immunology*, 187(2), pp. 676–683. doi: 10.4049/jimmunol.1003884.
- Colombo, M; Raposo, G; Théry, C. (2014) 'Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles.', *Annual review of cell and developmental biology*, 30, pp. 255–289.
- Couto, M. *et al.* (2019) 'The interplay between glioblastoma and microglia cells leads to

endothelial cell monolayer dysfunction via the interleukin-6-induced JAK2/STAT3 pathway.’, *Journal of cellular physiology*. United States, 234(11), pp. 19750–19760. doi: 10.1002/jcp.28575.

Coy, S. *et al.* (2022) ‘Single cell spatial analysis reveals the topology of immunomodulatory purinergic signaling in glioblastoma.’, *Nature communications*. England, 13(1), p. 4814. doi: 10.1038/s41467-022-32430-w.

Crespo, I. *et al.* (2015) ‘Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme’, *The American Journal of Pathology*, 185(7), pp. 1820–1833. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.023>.

Dang, L. *et al.* (2009) ‘Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate.’, *Nature*, 462(7274), pp. 739–744. doi: 10.1038/nature08617.

Datta, A. *et al.* (2017) ‘Manumycin A suppresses exosome biogenesis and secretion via targeted inhibition of Ras/Raf/ERK1/2 signaling and hnRNP H1 in castration-resistant prostate cancer cells.’, *Cancer letters*. Ireland, 408, pp. 73–81. doi: 10.1016/j.canlet.2017.08.020.

Davidson, T. B. *et al.* (2019) ‘Expression of PD-1 by T Cells in Malignant Glioma Patients Reflects Exhaustion and Activation.’, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. United States, 25(6), pp. 1913–1922. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1176.

Davies, L. C. *et al.* (2013) ‘Tissue-resident macrophages.’, *Nature immunology*. United States, 14(10), pp. 986–995. doi: 10.1038/ni.2705.

Deaglio, S. *et al.* (2007) ‘Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression’, *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6), pp. 1257–1265. doi: 10.1084/jem.20062512.

DeBerardinis, R. J. and Chandel, N. S. (2016) ‘Fundamentals of cancer metabolism.’, *Science advances*. United States, 2(5), p. e1600200. doi: 10.1126/sciadv.1600200.

Deng, G. *et al.* (2019) ‘Foxp3 Post-translational Modifications and Treg Suppressive Activity.’, *Frontiers in immunology*. Switzerland, 10, p. 2486. doi: 10.3389/fimmu.2019.02486.

Djuzenova, C. S. *et al.* (2015) ‘Actin cytoskeleton organization, cell surface modification and invasion rate of 5 glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status.’, *Experimental cell research*. United States, 330(2), pp. 346–357. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.013.

- Downs-Canner, S. M. *et al.* (2022) 'B Cell Function in the Tumor Microenvironment.', *Annual review of immunology*. United States, 40, pp. 169–193. doi: 10.1146/annurev-immunol-101220-015603.
- Dunn, G. P. *et al.* (2002) 'Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.', *Nature immunology*. United States, 3(11), pp. 991–998. doi: 10.1038/ni1102-991.
- Dwivedi, S. *et al.* (2021) 'CD38 and Regulation of the Immune Response Cells in Cancer.', *Journal of oncology*. Egypt, 2021, p. 6630295. doi: 10.1155/2021/6630295.
- Effros, R. B. *et al.* (1994) 'Decline in CD28<sup>+</sup> T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence.', *Experimental gerontology*. England, 29(6), pp. 601–609. doi: 10.1016/0531-5565(94)90073-6.
- England, B., Huang, T. and Karsy, M. (2013) 'Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme.', *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. Netherlands, 34(4), pp. 2063–2074. doi: 10.1007/s13277-013-0871-3.
- Figueiró, F. *et al.* (2016) 'Phenotypic and functional characteristics of CD39<sup>high</sup> human regulatory B cells (Breg)', *OncoImmunology*, 5. doi: 10.1080/2162402X.2015.1082703.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y. (2003) 'Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells.', *Nature immunology*. United States, 4(4), pp. 330–336. doi: 10.1038/ni904.
- Fridman, W. H. *et al.* (2012) 'The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome', *Nature Reviews Cancer*. doi: 10.1038/nrc3245.
- Friebel, E. *et al.* (2020) 'Single-Cell Mapping of Human Brain Cancer Reveals Tumor-Specific Instruction of Tissue-Invasive Leukocytes.', *Cell*. United States, 181(7), pp. 1626-1642.e20. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.055.
- Furnari, F. B. *et al.* (2007) 'Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.1596707.
- Gabrusiewicz, K. *et al.* (2016) 'Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype.', *JCI insight*. United States, 1(2). doi: 10.1172/jci.insight.85841.
- Ganeshan, K. and Chawla, A. (2014) 'Metabolic regulation of immune responses.', *Annual review of immunology*. United States, 32, pp. 609–634. doi: 10.1146/annurev-immunol-

032713-120236.

Garcia, J. H., Jain, S. and Aghi, M. K. (2021) 'Metabolic Drivers of Invasion in Glioblastoma.', *Frontiers in cell and developmental biology*. Switzerland, 9, p. 683276. doi: 10.3389/fcell.2021.683276.

Garcia, N. A. *et al.* (2015) 'Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells', *PLOS ONE*. Public Library of Science, 10(9), p. e0138849. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138849>.

Gastpar, R. *et al.* (2005) 'Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3804.

Gavrilovic, I. T. and Posner, J. B. (2005) 'Brain metastases: epidemiology and pathophysiology.', *Journal of neuro-oncology*. United States, 75(1), pp. 5–14. doi: 10.1007/s11060-004-8093-6.

Gentric, G., Mieulet, V. and Mechta-Grigoriou, F. (2017) 'Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field.', *Antioxidants & redox signaling*. United States, 26(9), pp. 462–485. doi: 10.1089/ars.2016.6750.

Ghouzlani, A. *et al.* (2021) 'Immune Checkpoint Inhibitors in Human Glioma Microenvironment.', *Frontiers in immunology*. Switzerland, 12, p. 679425. doi: 10.3389/fimmu.2021.679425.

Gonzalez-King, H. *et al.* (2017) 'Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes.', *Stem cells (Dayton, Ohio)*. England, 35(7), pp. 1747–1759. doi: 10.1002/stem.2618.

Gu, X. *et al.* (2015) 'Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice.', *International journal of cancer*. United States, 136(4), pp. E74–84. doi: 10.1002/ijc.29100.

Guo, G. and Cui, Y. (2015) 'New perspective on targeting the tumor suppressor p53 pathway in the tumor microenvironment to enhance the efficacy of immunotherapy', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3(1), p. 9. doi: 10.1186/s40425-015-0053-5.

Guo, X. *et al.* (2019) 'Glioma exosomes mediate the expansion and function of myeloid-derived suppressor cells through microRNA-29a/Hbp1 and microRNA-92a/Prkar1a pathways', *International Journal of Cancer*. doi: 10.1002/ijc.32052.

- Guo, Y. *et al.* (2022) 'In situ generation of micrometer-sized tumor cell-derived vesicles as autologous cancer vaccines for boosting systemic immune responses', *Nature Communications*, 13(1), p. 6534. doi: 10.1038/s41467-022-33831-7.
- Gupta, P. *et al.* (2022) 'Tumor Derived Extracellular Vesicles Drive T Cell Exhaustion in Tumor Microenvironment through Sphingosine Mediated Signaling and Impacting Immunotherapy Outcomes in Ovarian Cancer', *Advanced Science*. John Wiley & Sons, Ltd, 9(14), p. 2104452. doi: <https://doi.org/10.1002/advs.202104452>.
- Han, S. *et al.* (2020) 'IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets.', *British journal of cancer*. England, 122(11), pp. 1580–1589. doi: 10.1038/s41416-020-0814-x.
- Hanahan, D. (2022) 'Hallmarks of Cancer: New Dimensions.', *Cancer discovery*. United States, 12(1), pp. 31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- Hanahan, D. and Coussens, L. M. (2012) 'Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment', *Cancer Cell*. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The hallmarks of cancer.', *Cell*. United States, 100(1), pp. 57–70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*. Elsevier Inc., 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hao, Y. *et al.* (2021) 'The effects of tumor-derived exosomes on T-cell function and efficacy of cancer immunotherapy', *ImmunoMedicine*. John Wiley & Sons, Ltd, 1(2), p. e1029. doi: <https://doi.org/10.1002/imed.1029>.
- Harshyne, Larry A *et al.* (2015) 'Glioblastoma exosomes and IGF-1R/AS-ODN are immunogenic stimuli in a translational research immunotherapy paradigm.', *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. Germany, 64(3), pp. 299–309. doi: 10.1007/s00262-014-1622-z.
- Harshyne, Larry A. *et al.* (2015) 'Glioblastoma exosomes and IGF-1R/AS-ODN are immunogenic stimuli in a translational research immunotherapy paradigm', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(3), pp. 299–309. doi: 10.1007/s00262-014-1622-z.
- Hartmann, C. *et al.* (2009) 'Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas.', *Acta neuropathologica*. Germany, 118(4), pp. 469–474. doi: 10.1007/s00401-009-0561-9.



- Hatzikirou, H. *et al.* (2012) “Go or grow”: the key to the emergence of invasion in tumour progression?, *Mathematical medicine and biology : a journal of the IMA*. England, 29(1), pp. 49–65. doi: 10.1093/imammb/dqq011.
- Heimberger, A. B. *et al.* (2008) ‘Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas.’, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. United States, 14(16), pp. 5166–5172. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0320.
- Hellwinkel, J. E. *et al.* (2015) ‘Glioma-derived extracellular vesicles selectively suppress immune responses’, *Neuro-Oncology*, 18(4), pp. 497–506. doi: 10.1093/neuonc/nov170.
- Hiam-Galvez, K. J., Allen, B. M. and Spitzer, M. H. (2021) ‘Systemic immunity in cancer’, *Nature Reviews Cancer*, 21(6), pp. 345–359. doi: 10.1038/s41568-021-00347-z.
- Ho, P.-C. *et al.* (2015) ‘Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses.’, *Cell*. United States, 162(6), pp. 1217–1228. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.012.
- Houillier, C. *et al.* (2010) ‘IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas.’, *Neurology*. United States, 75(17), pp. 1560–1566. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181f96282.
- Hu, W. *et al.* (2020) ‘Enhanced immunogenicity of leukemia-derived exosomes via transfection with lentiviral vectors encoding costimulatory molecules.’, *Cellular oncology (Dordrecht)*. Netherlands, 43(5), pp. 889–900. doi: 10.1007/s13402-020-00535-3.
- Huang, J. *et al.* (2016) ‘Differential Expression of Adenosine P1 Receptor ADORA1 and ADORA2A Associated with Glioma Development and Tumor-Associated Epilepsy.’, *Neurochemical research*. United States, 41(7), pp. 1774–1783. doi: 10.1007/s11064-016-1893-1.
- Huang, Y.-J. *et al.* (2019) ‘ATP Synthase Subunit Epsilon Overexpression Promotes Metastasis by Modulating AMPK Signaling to Induce Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Is a Poor Prognostic Marker in Colorectal Cancer Patients.’, *Journal of clinical medicine*. Switzerland, 8(7). doi: 10.3390/jcm8071070.
- Humphries, W. *et al.* (2010) ‘The role of tregs in glioma-mediated immunosuppression: potential target for intervention.’, *Neurosurgery clinics of North America*. United States, 21(1), pp. 125–137. doi: 10.1016/j.nec.2009.08.012.
- Ichimura, K. *et al.* (2009) ‘IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas

but rare in primary glioblastomas.’, *Neuro-oncology*. England, 11(4), pp. 341–347. doi: 10.1215/15228517-2009-025.

Ichimura, K. (2012) ‘Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas.’, *Brain tumor pathology*. Japan, 29(3), pp. 131–139. doi: 10.1007/s10014-012-0090-4.

Jiang, P., Du, W. and Yang, X. (2013) ‘A critical role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in TAp73-mediated cell proliferation.’, *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. United States, 12(24), pp. 3720–3726. doi: 10.4161/cc.27267.

Jiang, S. *et al.* (2023) ‘Metabolic dialogs between B cells and the tumor microenvironment: Implications for anticancer immunity’, *Cancer Letters*, 556, p. 216076. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216076>.

Kalra, H., Drummen, G. P. C. and Mathivanan, S. (2016) ‘Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing’, *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms17020170.

Kannan, K. *et al.* (2012) ‘Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma.’, *Oncotarget*. United States, 3(10), pp. 1194–1203. doi: 10.18632/oncotarget.689.

Kastenhuber, E. R. and Lowe, S. W. (2017) ‘Putting p53 in Context.’, *Cell*. United States, 170(6), pp. 1062–1078. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.028.

Khurshed, M. *et al.* (2021) ‘A Phase Ib Clinical Trial of Metformin and Chloroquine in Patients with IDH1-Mutated Solid Tumors.’, *Cancers*. Switzerland, 13(10). doi: 10.3390/cancers13102474.

Kishore, M. *et al.* (2017) ‘Regulatory T Cell Migration Is Dependent on Glucokinase-Mediated Glycolysis.’, *Immunity*. United States, 47(5), pp. 875-889.e10. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.017.

Klemm, F. *et al.* (2020) ‘Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells.’, *Cell*. United States, 181(7), pp. 1643-1660.e17. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.007.

Kohanbash, G. *et al.* (2017) ‘Isocitrate dehydrogenase mutations suppress STAT1 and CD8+ T cell accumulation in gliomas.’, *The Journal of clinical investigation*. United States, 127(4), pp. 1425–1437. doi: 10.1172/JCI90644.

- Krex, D. *et al.* (2003) ‘Genetic analysis of a multifocal glioblastoma multiforme: a suitable tool to gain new aspects in glioma development.’, *Neurosurgery*. United States, 53(6), pp. 1377–84; discussion 1384. doi: 10.1227/01.neu.0000093426.29236.86.
- Kumar, B. *et al.* (2015) ‘Resveratrol inhibits TIGAR to promote ROS induced apoptosis and autophagy’, *Biochimie*, 118, pp. 26–35. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.016>.
- Labani-Motlagh, A., Ashja-Mahdavi, M. and Loskog, A. (2020) ‘The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses.’, *Frontiers in immunology*. Switzerland, 11, p. 940. doi: 10.3389/fimmu.2020.00940.
- Lan, Y.-L. *et al.* (2023) ‘Update on the current knowledge of lymphatic drainage system and its emerging roles in glioma management.’, *Immunology*. England, 168(2), pp. 233–247. doi: 10.1111/imm.13517.
- Ledur, P. F. *et al.* (2017) ‘Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries?’, *Oncotarget*, 8(40), pp. 69185–69197. doi: 10.18632/oncotarget.20193.
- Lee, H. *et al.* (2022) ‘Glioblastoma-Derived Exosomes as Nanopharmaceutics for Improved Glioma Treatment.’, *Pharmaceutics*. Switzerland, 14(5). doi: 10.3390/pharmaceutics14051002.
- Lee, J. *et al.* (2006) ‘Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines.’, *Cancer cell*. United States, 9(5), pp. 391–403. doi: 10.1016/j.ccr.2006.03.030.
- Lee, S. H. *et al.* (2004) ‘Role of NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>-ICDH) on cellular defence against oxidative injury by gamma-rays.’, *International journal of radiation biology*. England, 80(9), pp. 635–642. doi: 10.1080/09553000400007680.
- Li, I. and Nabet, B. Y. (2019) ‘Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance’, *Molecular Cancer*, 18(1), p. 32. doi: 10.1186/s12943-019-0975-5.
- Li, S. *et al.* (2013) ‘Overexpression of isocitrate dehydrogenase mutant proteins renders glioma cells more sensitive to radiation.’, *Neuro-oncology*. England, 15(1), pp. 57–68. doi: 10.1093/neuonc/nos261.
- Lin, H. *et al.* (2017) ‘Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells.’, *Neuro-oncology*. England, 19(1), pp. 43–54. doi: 10.1093/neuonc/now128.

- Liu, H. *et al.* (2017) 'Co-delivery of tumor-derived exosomes with alpha-galactosylceramide on dendritic cell-based immunotherapy for glioblastoma', *Cancer Letters*, 411, pp. 182–190. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.022>.
- Logozzi, M. *et al.* (2019) 'Extracellular acidity and increased exosome release as key phenotypes of malignant tumors.', *Cancer metastasis reviews*. Netherlands, 38(1–2), pp. 93–101. doi: 10.1007/s10555-019-09783-8.
- Lopez, G. Y. *et al.* (2010) 'IDH1(R132) mutation identified in one human melanoma metastasis, but not correlated with metastases to the brain.', *Biochemical and biophysical research communications*. United States, 398(3), pp. 585–587. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.125.
- Louis, D. N. *et al.* (2007) 'The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System', *Acta Neuropathologica*, 114, pp. 97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- Louis, David N *et al.* (2016) 'The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 131(6), pp. 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Louis, David N. *et al.* (2016) 'The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary', *Acta Neuropathologica*. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Louis, D. N. *et al.* (2021) 'The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.', *Neuro-oncology*, 23(8), pp. 1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106.
- Louveau, A. *et al.* (2015) 'Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels', *Nature*, 523(7560), pp. 337–341. doi: 10.1038/nature14432.
- Louveau, A., Harris, T. H. and Kipnis, J. (2015) 'Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege', *Trends in Immunology*, 36(10), pp. 569–577. doi: <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.006>.
- Ludwig, N. *et al.* (2020) 'Simultaneous Inhibition of Glycolysis and Oxidative Phosphorylation Triggers a Multi-Fold Increase in Secretion of Exosomes: Possible Role of 2',3'-cAMP', *Scientific Reports*, 10(1), p. 6948. doi: 10.1038/s41598-020-63658-5.
- Lyssiotis, C. A. and Kimmelman, A. C. (2017) 'Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment.', *Trends in cell biology*. England, 27(11), pp. 863–875. doi: 10.1016/j.tcb.2017.06.003.

- Mandapathil, M. *et al.* (2010) ‘Adenosine and Prostaglandin E<sub>2</sub> Cooperate in the Suppression of Immune Responses Mediated by Adaptive Regulatory T Cells’, *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), pp. 27571–27580. doi: 10.1074/jbc.M110.127100.
- Martínez-Ramírez, A. S. *et al.* (2017) ‘Nucleotides and nucleoside signaling in the regulation of the epithelium to mesenchymal transition (EMT).’, *Purinergic signalling*. Netherlands, 13(1), pp. 1–12. doi: 10.1007/s11302-016-9550-3.
- Marusyk, A., Janiszewska, M. and Polyak, K. (2020) ‘Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance.’, *Cancer cell*. United States, 37(4), pp. 471–484. doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.007.
- Masters, J. R. *et al.* (2001) ‘Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 98(14), pp. 8012–8017. doi: 10.1073/pnas.121616198.
- McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S. and Wherry, E. J. (2019) ‘CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer.’, *Annual review of immunology*. United States, 37, pp. 457–495. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055318.
- Meng, L. *et al.* (2022) ‘ATRX status in patients with gliomas: Radiomics analysis.’, *Medicine*. United States, 101(37), p. e30189. doi: 10.1097/MD.00000000000030189.
- Mirzaei, R., Sarkar, S. and Yong, V. W. (2017) ‘T Cell Exhaustion in Glioblastoma: Intricacies of Immune Checkpoints.’, *Trends in immunology*. England, 38(2), pp. 104–115. doi: 10.1016/j.it.2016.11.005.
- Modrek, A. S. *et al.* (2017) ‘Low-Grade Astrocytoma Mutations in IDH1, P53, and ATRX Cooperate to Block Differentiation of Human Neural Stem Cells via Repression of SOX2.’, *Cell reports*. United States, 21(5), pp. 1267–1280. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.009.
- Molenaar, R. J. *et al.* (2014) ‘The driver and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation.’, *Biochimica et biophysica acta*. Netherlands, 1846(2), pp. 326–341. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.05.004.
- Molenaar, R. J. *et al.* (2015) ‘Radioprotection of IDH1-Mutated Cancer Cells by the IDH1-Mutant Inhibitor AGI-5198.’, *Cancer research*. United States, 75(22), pp. 4790–4802. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3603.
- Molenaar, R. J. *et al.* (2018) ‘Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses.’, *Oncogene*. England, 37(15), pp. 1949–1960. doi: 10.1038/s41388-017-0077-z.

- Montecalvo, A. *et al.* (2008) 'Exosomes As a Short-Range Mechanism to Spread Alloantigen between Dendritic Cells during T Cell Allorecognition', *The Journal of Immunology*. doi: 10.4049/jimmunol.180.5.3081.
- Mukherjee, J. *et al.* (2013) 'Pyruvate Kinase M2 Expression, but Not Pyruvate Kinase Activity, Is Up-Regulated in a Grade-Specific Manner in Human Glioma', *PLOS ONE*. Public Library of Science, 8(2), p. e57610. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057610>.
- Muller, L. *et al.* (2017) 'Human tumor-derived exosomes (TEX) regulate Treg functions via cell surface signaling rather than uptake mechanisms', *OncoImmunology*. Taylor & Francis, 6(8), pp. 1–9. doi: 10.1080/2162402X.2016.1261243.
- Muralidharan-Chari, V. *et al.* (2009) 'ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2009.09.059.
- Nagel, Z. D. *et al.* (2017) 'DNA repair capacity in multiple pathways predicts chemoresistance in glioblastoma multiforme', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1151.
- Najafloo, M. *et al.* (2022) 'Tumor-Derived Extracellular Vesicles in Cancer Immunoediting and Their Potential as Oncoimmunotherapeutics.', *Cancers*. Switzerland, 15(1). doi: 10.3390/cancers15010082.
- Neo, S. Y. *et al.* (2020) 'CD73 immune checkpoint defines regulatory NK cells within the tumor microenvironment.', *The Journal of clinical investigation*, 130(3), pp. 1185–1198. doi: 10.1172/JCI128895.
- Ning, Y. *et al.* (2018) 'Tumor exosomes block dendritic cells maturation to decrease the T cell immune response.', *Immunology letters*. Netherlands, 199, pp. 36–43. doi: 10.1016/j.imlet.2018.05.002.
- Nobusawa, S. *et al.* (2009) 'IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas', *Clinical Cancer Research*, 15(19), pp. 6002–6007. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0715.
- Nogueira, L. *et al.* (2011) 'The NFκB pathway: A therapeutic target in glioblastoma', *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.322.
- Norden, A. D., Drappatz, J. and Wen, P. Y. (2010) '5 - Malignant Gliomas in Adults', in Rees, J. and Wen, P. Y. B. T.-B. B. of N. (eds) *Neuro-Oncology*. Butterworth-Heinemann, pp. 99–120. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-7516-1.00005-0>.

- Notarangelo, G. *et al.* (2022) ‘Oncometabolite d-2HG alters T cell metabolism to impair CD8(+) T cell function.’, *Science (New York, N.Y.)*. United States, 377(6614), pp. 1519–1529. doi: 10.1126/science.abj5104.
- Novack, G. V *et al.* (2020) ‘Mitochondrial Supercomplexes: Physiological Organization and Dysregulation in Age-Related Neurodegenerative Disorders.’, *Frontiers in endocrinology*. Switzerland, 11, p. 600. doi: 10.3389/fendo.2020.00600.
- Noy, R. and Pollard, J. W. (2014) ‘Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy.’, *Immunity*. United States, 41(1), pp. 49–61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
- Oliveira, A. I. *et al.* (2017) ‘Crosstalk between glial and glioblastoma cells triggers the “go-or-grow” phenotype of tumor cells.’, *Cell communication and signaling : CCS*. England, 15(1), p. 37. doi: 10.1186/s12964-017-0194-x.
- Ostrom, Q. T. *et al.* (2017) ‘CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014.’, *Neuro-oncology*. England, 19(suppl\_5), pp. v1–v88. doi: 10.1093/neuonc/nox158.
- Pacella, I. *et al.* (2018) ‘Fatty acid metabolism complements glycolysis in the selective regulatory T cell expansion during tumor growth’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(28), pp. E6546–E6555. doi: 10.1073/pnas.1720113115.
- Park, C.-M. *et al.* (2006) ‘Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin.’, *International journal of oncology*. Greece, 28(1), pp. 119–125.
- Park, J. H. *et al.* (2022) ‘PKM2 Is Overexpressed in Glioma Tissues, and Its Inhibition Highly Increases Late Apoptosis in U87MG Cells With Low-density Specificity.’, *In vivo (Athens, Greece)*. Greece, 36(2), pp. 694–703. doi: 10.21873/invivo.12755.
- Parolini, I. *et al.* (2009) ‘Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells’, *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp. 34211–34222. doi: 10.1074/jbc.M109.041152.
- Parsons, D. W. *et al.* (2008) ‘An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme.’, *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897), pp. 1807–1812. doi: 10.1126/science.1164382.
- Paschka, P. *et al.* (2010) ‘IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute

- myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication.’, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. United States, 28(22), pp. 3636–3643. doi: 10.1200/JCO.2010.28.3762.
- Patel, H. *et al.* (2018) ‘Modulating secreted components of tumor microenvironment: A masterstroke in tumor therapeutics.’, *Cancer biology & therapy*. United States, 19(1), pp. 3–12. doi: 10.1080/15384047.2017.1394538.
- Patton, D. T. *et al.* (2011) ‘The PI3K p110 $\delta$  regulates expression of CD38 on regulatory T cells.’, *PloS one*, 6(3), p. e17359. doi: 10.1371/journal.pone.0017359.
- Pavlova, N. N., Zhu, J. and Thompson, C. B. (2022) ‘The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging.’, *Cell metabolism*. United States, 34(3), pp. 355–377. doi: 10.1016/j.cmet.2022.01.007.
- Perenkov, A. D. *et al.* (2012) ‘[Heterogeneous expression of CD38 gene in tumor tissue in patients with colorectal cancer].’, *Molekuliarnaia biologii*. Russia (Federation), 46(5), pp. 786–791.
- Pollard, S. M. *et al.* (2009) ‘Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens.’, *Cell stem cell*. United States, 4(6), pp. 568–580. doi: 10.1016/j.stem.2009.03.014.
- Porter, K. R. *et al.* (2010) ‘Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology’, *Neuro-Oncology*, 12(6), pp. 520–527.
- Qi, Yu *et al.* (2020) ‘Tumor-infiltrating CD39(+)CD8(+) T cells determine poor prognosis and immune evasion in clear cell renal cell carcinoma patients.’, *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. Germany, 69(8), pp. 1565–1576. doi: 10.1007/s00262-020-02563-2.
- Qiao, L. *et al.* (2020) ‘Tumor cell-derived exosomes home to their cells of origin and can be used as Trojan horses to deliver cancer drugs.’, *Theranostics*. Australia, 10(8), pp. 3474–3487. doi: 10.7150/thno.39434.
- Quail, D. F. and Joyce, J. A. (2013) ‘Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.’, *Nature medicine*. United States, 19(11), pp. 1423–1437. doi: 10.1038/nm.3394.
- Quinones, A. and Le, A. (2018) ‘The Multifaceted Metabolism of Glioblastoma.’, *Advances in experimental medicine and biology*. United States, 1063, pp. 59–72. doi: 10.1007/978-3-319-77736-8\_4.



- Rao, Q. *et al.* (2016) ‘Tumor-derived exosomes elicit tumor suppression in murine hepatocellular carcinoma models and humans in vitro’, *Hepatology*, 64(2), pp. 456–472. doi: 10.1002/hep.28549.
- Raposo, G. (1996) ‘B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles’, *Journal of Experimental Medicine*, 183(3), pp. 1161–1172. doi: 10.1084/jem.183.3.1161.
- Ricklefs, F. L. *et al.* (2023) ‘Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles’, *Science Advances*. American Association for the Advancement of Science, 4(3), p. eaar2766. doi: 10.1126/sciadv.aar2766.
- Rockenbach, L. *et al.* (2014) ‘NTPDase3 and ecto-5’-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression.’, *Purinergic signalling*, 10(3), pp. 421–430. doi: 10.1007/s11302-014-9405-8.
- Ruffell, B. *et al.* (2010) ‘Lymphocytes in cancer development: Polarization towards pro-tumor immunity’, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.002.
- Sahm, F. *et al.* (2014) ‘Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma.’, *Acta neuropathologica*. Germany, 128(4), pp. 551–559. doi: 10.1007/s00401-014-1326-7.
- Sanai, N. and Berger, M. S. (2018) ‘Surgical oncology for gliomas: the state of the art.’, *Nature reviews. Clinical oncology*. England, 15(2), pp. 112–125. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.171.
- Sayour, E. J. *et al.* (2015) ‘Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma’, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(4), pp. 419–427. doi: 10.1007/s00262-014-1651-7.
- Saze, Z. *et al.* (2013) ‘Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells’, *Blood*, 122(July), pp. 9–19. doi: 10.1182/blood-2013-02-482406.Z.S.
- Scharping, N. E. *et al.* (2016) ‘The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction.’, *Immunity*. United States, 45(2), pp. 374–388. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.009.
- Schietinger, A. *et al.* (2016) ‘Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis.’, *Immunity*. United States, 45(2), pp. 389–401. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.011.

- Schiffer, D. *et al.* (2019) ‘Glioblastoma: Microenvironment and niche concept’, *Cancers*. doi: 10.3390/cancers11010005.
- Scholl, J. N., De Fraga Dias, A., *et al.* (2020) ‘Characterization and antiproliferative activity of glioma-derived extracellular vesicles’, *Nanomedicine*, 15(10), pp. 1001–1018. doi: 10.2217/nmm-2019-0431.
- Scholl, J. N., Dias, C. K., *et al.* (2020) ‘Extracellular vesicles in cancer progression: Are they part of the problem or part of the solution?’, *Nanomedicine*. doi: 10.2217/nmm-2020-0256.
- Schorey, J. S. and Bhatnagar, S. (2008) ‘Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology’, *Traffic*, 9(6), pp. 871–881. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x.
- Schuler, P. J. *et al.* (2011) ‘Separation of human CD4+CD39+ T cells by magnetic beads reveals two phenotypically and functionally different subsets.’, *Journal of immunological methods*. Netherlands, 369(1–2), pp. 59–68. doi: 10.1016/j.jim.2011.04.004.
- Schwartzbaum, J. A. *et al.* (2006) ‘Epidemiology and molecular pathology of glioma’, *Nature Clinical Practice Neurology*. doi: 10.1038/ncpneuro0289.
- Shao, Q. *et al.* (2020) ‘Involvement of MM cell-derived exosomes in T lymphocytes immune responses.’, *Oncology letters*. Greece, 20(4), p. 31. doi: 10.3892/ol.2020.11892.
- Shi, S. *et al.* (2018) ‘Dendritic Cells Pulsed with Exosomes in Combination with PD-1 Antibody Increase the Efficacy of Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma Model.’, *Translational oncology*. United States, 11(2), pp. 250–258. doi: 10.1016/j.tranon.2018.01.001.
- Sjöblom, T. *et al.* (2006) ‘The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers.’, *Science (New York, N.Y.)*. United States, 314(5797), pp. 268–274. doi: 10.1126/science.1133427.
- Soffietti, R., Leoncini, B. and Rudà, R. (2007) ‘New developments in the treatment of malignant gliomas’, *Expert Review in Neurotherapeutics*, 7(10), pp. 1313–1326.
- Solinas, G. *et al.* (2009) ‘Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation’, *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5), pp. 1065–1073. doi: 10.1189/jlb.0609385.
- SongTao, Q. *et al.* (2012) ‘IDH mutations predict longer survival and response to temozolomide in secondary glioblastoma.’, *Cancer science*. England, 103(2), pp. 269–273. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02134.x.

- Sottoriva, A. *et al.* (2013) 'Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 110(10), pp. 4009–4014. doi: 10.1073/pnas.1219747110.
- Speransky, S. *et al.* (2019) 'A novel RNA aptamer identifies plasma membrane ATP synthase beta subunit as an early marker and therapeutic target in aggressive cancer.', *Breast cancer research and treatment*. Netherlands, 176(2), pp. 271–289. doi: 10.1007/s10549-019-05174-3.
- Stagg, J. and Smyth, M. J. (2010) 'Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 29(39), pp. 5346–5358. doi: 10.1038/onc.2010.292.
- Stanke, K. M., Wilson, C. and Kidambi, S. (2021) 'High Expression of Glycolytic Genes in Clinical Glioblastoma Patients Correlates With Lower Survival.', *Frontiers in molecular biosciences*. Switzerland, 8, p. 752404. doi: 10.3389/fmolb.2021.752404.
- Stuani, L., Sabatier, M. and Sarry, J.-E. (2019) 'Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia', *BMC Biology*, 17(1), p. 57. doi: 10.1186/s12915-019-0670-4.
- Stupp, R. *et al.* (2005) 'Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma', *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/nejmoa043330.
- Stupp, R. *et al.* (2009) 'Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study : 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial', *Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 10(5), pp. 459–466. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
- Suárez, H. *et al.* (2017) 'A bead-assisted flow cytometry method for the semi-quantitative analysis of Extracellular Vesicles', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-11249-2.
- Sun, X. and Turcan, S. (2021) 'From Laboratory Studies to Clinical Trials: Temozolomide Use in IDH-Mutant Gliomas.', *Cells*. Switzerland, 10(5). doi: 10.3390/cells10051225.
- Sung, H. *et al.* (2021) 'Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. doi: 10.3322/caac.21660.
- Suzuki, A. *et al.* (2019) 'Subcellular compartmentalization of PKM2 identifies anti-PKM2 therapy response in vitro and in vivo mouse model of human non-small-cell lung cancer.', *PloS*

- one. United States, 14(5), p. e0217131. doi: 10.1371/journal.pone.0217131.
- Swanton, C. (2012) ‘Intratumor heterogeneity: evolution through space and time.’, *Cancer research*. United States, 72(19), pp. 4875–4882. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2217.
- Takenaka, M. C., Robson, S. and Quintana, F. J. (2016) ‘Regulation of the T Cell Response by CD39.’, *Trends in immunology*. England, 37(7), pp. 427–439. doi: 10.1016/j.it.2016.04.009.
- Tateishi, K. *et al.* (2015) ‘Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD<sup>+</sup> Depletion.’, *Cancer cell*. United States, 28(6), pp. 773–784. doi: 10.1016/j.ccell.2015.11.006.
- TCGA (2015) ‘Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas’, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 372(26), pp. 2481–2498. doi: 10.1056/NEJMoa1402121.
- Thakur, A. *et al.* (2022) ‘Exosomes: Small vesicles with big roles in cancer, vaccine development, and therapeutics.’, *Bioactive materials*. China, 10, pp. 281–294. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.08.029.
- Théry, C. *et al.* (2018) ‘Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines’, *Journal of Extracellular Vesicles*. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- Timperi, E. *et al.* (2016) ‘Regulatory T cells with multiple suppressive and potentially pro-tumor activities accumulate in human colorectal cancer.’, *Oncoimmunology*. United States, 5(7), p. e1175800. doi: 10.1080/2162402X.2016.1175800.
- Torrise, F. *et al.* (2022) ‘The Hallmarks of Glioblastoma: Heterogeneity, Intercellular Crosstalk and Molecular Signature of Invasiveness and Progression.’, *Biomedicines*. Switzerland, 10(4). doi: 10.3390/biomedicines10040806.
- Trachootham, D., Alexandre, J. and Huang, P. (2009) ‘Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?’, *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(7), pp. 579–591. doi: 10.1038/nrd2803.
- Trams, E. G. *et al.* (1981) ‘Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles’, *BBA - Biomembranes*, 645(1), pp. 63–70. doi: 10.1016/0005-2736(81)90512-5.
- Valadi, H. *et al.* (2007) ‘Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.’, *Nature cell biology*. England, 9(6), pp. 654–

659. doi: 10.1038/ncb1596.

Vigano, S. *et al.* (2019) 'Targeting Adenosine in Cancer Immunotherapy to Enhance T-Cell Function.', *Frontiers in immunology*. Switzerland, 10, p. 925. doi: 10.3389/fimmu.2019.00925.

Di Virgilio, F. *et al.* (2018) 'Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment', *Nature Reviews Cancer*, 18(10), pp. 601–618. doi: 10.1038/s41568-018-0037-0.

Di Virgilio, F. and Adinolfi, E. (2017) 'Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth', *Oncogene*, 36(3), pp. 293–303. doi: 10.1038/onc.2016.206.

Vogelstein, B. *et al.* (2013) 'Cancer genome landscapes.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 339(6127), pp. 1546–1558. doi: 10.1126/science.1235122.

Wahl, D. R. *et al.* (2017) 'Glioblastoma Therapy Can Be Augmented by Targeting IDH1-Mediated NADPH Biosynthesis.', *Cancer research*. United States, 77(4), pp. 960–970. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2008.

Waitkus, M. S., Diplas, B. H. and Yan, H. (2018) 'Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer.', *Cancer cell*. United States, 34(2), pp. 186–195. doi: 10.1016/j.ccell.2018.04.011.

Wang, J. *et al.* (2020) 'circRNA-002178 act as a ceRNA to promote PDL1/PD1 expression in lung adenocarcinoma.', *Cell death & disease*. England, 11(1), p. 32. doi: 10.1038/s41419-020-2230-9.

Wang, M. *et al.* (2020) 'Exosomal LGALS9 in the cerebrospinal fluid of glioblastoma patients suppressed dendritic cell antigen presentation and cytotoxic T-cell immunity.', *Cell death & disease*. England, 11(10), p. 896. doi: 10.1038/s41419-020-03042-3.

Wanka, C. *et al.* (2012) 'Synthesis of cytochrome C oxidase 2: a p53-dependent metabolic regulator that promotes respiratory function and protects glioma and colon cancer cells from hypoxia-induced cell death.', *Oncogene*. England, 31(33), pp. 3764–3776. doi: 10.1038/onc.2011.530.

Warburg, O., Wind, F. and Negelein, E. (1927) 'THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY.', *The Journal of general physiology*. United States, 8(6), pp. 519–530. doi: 10.1085/jgp.8.6.519.

Ward, P. S. and Thompson, C. B. (2012) 'Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even

- warburg did not anticipate.’, *Cancer cell*. United States, 21(3), pp. 297–308. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.014.
- Weinberg, F. *et al.* (2010) ‘Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(19), pp. 8788–8793. doi: 10.1073/pnas.1003428107.
- Weller, M. *et al.* (2010) ‘MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?’, *Nature reviews. Neurology*. England, 6(1), pp. 39–51. doi: 10.1038/nrneurol.2009.197.
- Weller, M. *et al.* (2015) ‘Glioma.’, *Nature reviews. Disease primers*. England, 1, p. 15017. doi: 10.1038/nrdp.2015.17.
- Weng, N.-P., Akbar, A. N. and Goronzy, J. (2009) ‘CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function.’, *Trends in immunology*. England, 30(7), pp. 306–312. doi: 10.1016/j.it.2009.03.013.
- Wieckowski, E. U. *et al.* (2009) ‘Tumor-Derived Microvesicles Promote Regulatory T Cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8+ T Lymphocytes’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(6), pp. 3720–3730. doi: 10.1021/nl061786n.Core-Shell.
- Wolf, A. *et al.* (2011) ‘Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme.’, *The Journal of experimental medicine*. United States, 208(2), pp. 313–326. doi: 10.1084/jem.20101470.
- Wolfers, J. *et al.* (2001) ‘Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming’, *Nature Medicine*, 7(3), pp. 297–303. doi: 10.1038/85438.
- Wu, S. *et al.* (2020) ‘Metabolic Reprogramming Induces Immune Cell Dysfunction in the Tumor Microenvironment of Multiple Myeloma.’, *Frontiers in oncology*. Switzerland, 10, p. 591342. doi: 10.3389/fonc.2020.591342.
- Xavier, C. P. R. *et al.* (2020) ‘The Role of Extracellular Vesicles in the Hallmarks of Cancer and Drug Resistance.’, *Cells*. Switzerland, 9(5). doi: 10.3390/cells9051141.
- Xie, Y. *et al.* (2010) ‘Dendritic Cells Recruit T Cell Exosomes via Exosomal LFA-1 Leading to Inhibition of CD8+ CTL Responses through Downregulation of Peptide/MHC Class I and Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity’, *The Journal of Immunology*, 185(9), pp. 5268–5278. doi: 10.4049/jimmunol.1000386.

- Xie, Yufeng *et al.* (2010) ‘Membrane-bound HSP70-engineered myeloma cell-derived exosomes stimulate more efficient CD8(+) CTL- and NK-mediated antitumour immunity than exosomes released from heat-shocked tumour cells expressing cytoplasmic HSP70.’, *Journal of cellular and molecular medicine*. England, 14(11), pp. 2655–2666. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00851.x.
- Xu, G. and Li, J. Y. (2016) ‘ATP5A1 and ATP5B are highly expressed in glioblastoma tumor cells and endothelial cells of microvascular proliferation.’, *Journal of neuro-oncology*. United States, 126(3), pp. 405–413. doi: 10.1007/s11060-015-1984-x.
- Xu, S. *et al.* (2013) ‘Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas’, *Neuro-Oncology*, 15(9), pp. 1160–1172. doi: 10.1093/neuonc/not067.
- Yan, H. *et al.* (2009) ‘IDH1 and IDH2 mutations in gliomas.’, *The New England journal of medicine*, 360(8), pp. 765–773. doi: 10.1056/NEJMoa0808710.
- Yang, R. *et al.* (2019) ‘Distinct epigenetic features of tumor-reactive CD8+ T cells in colorectal cancer patients revealed by genome-wide DNA methylation analysis’, *Genome Biology*, 21(1), p. 2. doi: 10.1186/s13059-019-1921-y.
- Yang, T. *et al.* (2015) ‘Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio rerio.’, *Pharmaceutical research*. United States, 32(6), pp. 2003–2014. doi: 10.1007/s11095-014-1593-y.
- Yegutkin, G. G. (2008) ‘Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade.’, *Biochimica et biophysica acta*. Netherlands, 1783(5), pp. 673–694. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024.
- Yuan, L. *et al.* (2018) ‘A novel correlation between ATP5A1 gene expression and progression of human clear cell renal cell carcinoma identified by co-expression analysis.’, *Oncology reports*. Greece, 39(2), pp. 525–536. doi: 10.3892/or.2017.6132.
- Zawlik, I. *et al.* (2009) ‘Common polymorphisms in the MDM2 and TP53 genes and the relationship between TP53 mutations and patient outcomes in glioblastomas.’, *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. Switzerland, 19(2), pp. 188–194. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00170.x.
- Zhang, X. *et al.* (2015) ‘Exosomes in cancer: Small particle, big player’, *Journal of Hematology and Oncology*. doi: 10.1186/s13045-015-0181-x.

- Zhang, Y. *et al.* (2018) 'The p53 Pathway in Glioblastoma.', *Cancers*. Switzerland, 10(9). doi: 10.3390/cancers10090297.
- Zhou, Q. *et al.* (2009) 'Isolated CD39 expression on CD4+ T cells denotes both regulatory and memory populations.', *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. United States, 9(10), pp. 2303–2311. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02777.x.
- Zhou, W. and Wahl, D. R. (2019) 'Metabolic Abnormalities in Glioblastoma and Metabolic Strategies to Overcome Treatment Resistance.', *Cancers*. Switzerland, 11(9). doi: 10.3390/cancers11091231.
- Zhu, H. *et al.* (2017) 'IDH1 R132H Mutation Enhances Cell Migration by Activating AKT-mTOR Signaling Pathway, but Sensitizes Cells to 5-FU Treatment as NADPH and GSH Are Reduced.', *PloS one*. United States, 12(1), p. e0169038. doi: 10.1371/journal.pone.0169038.
- Zhu, Y. *et al.* (2020) 'CD38 Predicts Favorable Prognosis by Enhancing Immune Infiltration and Antitumor Immunity in the Epithelial Ovarian Cancer Microenvironment', *Frontiers in Genetics*, 11. doi: 10.3389/fgene.2020.00369.
- Zitvogel, L. *et al.* (1998) 'Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes', *Nature Medicine*, 4(5), pp. 594–600. doi: 10.1038/nm0598-594.
- Zumaquero, E. *et al.* (2010) 'Exosomes from human lymphoblastoid B cells express enzymatically active CD38 that is associated with signaling complexes containing CD81, Hsc-70 and Lyn', *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc., 316(16), pp. 2692–2706. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.05.032.



## ANEXOS

### Anexo I – Parecer consubstanciado CEP/UFRGS



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Investigação do papel do sistema purinérgico e de vesículas extracelulares na imunomodulação e progressão tumoral em pacientes com glioma

**Pesquisador:** FABRICIO FIGUEIRO

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 24997119.8.0000.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da

**Patrocinador Principal:** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.986.203

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se da análise do retorno de diligência do projeto de doutorado de Juliete Nathali Scholl, aluna no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da UFRGS.

A pesquisa será desenvolvida sob a orientação do Prof. Dr. Fabrício Figueiró, no período de 21/09/2019 a 27/02/2023.

##### Objetivo da Pesquisa:

**OBJETIVO GERAL:** "Investigar o papel do sistema purinérgico e de vesículas extracelulares na imunomodulação e progressão tumoral em pacientes com glioma".

##### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Caracterizar o sistema purinérgico nos diferentes graus de glioma (II, III, IV);
2. Caracterizar o sangue periférico e o microambiente tumoral nos diferentes graus de glioma quanto a presença de linfócitos B e T e células NK;
3. Estabelecer cultura primária dos tumores;
4. Avaliar a ativação de linfócitos B e T periféricos após a incubação com VEs derivadas de sangue periférico de pacientes com glioma ou cultura primária de células de GBM, na presença ou não de inibidor da enzima CD73;

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3736 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 3.986.203

5. Isolar as VEs presentes no sangue periférico de pacientes com GBM;
6. Caracterizar as VEs quanto à expressão dos marcadores clássicos e purinérgicos;
7. Quantificar a expressão dos miRNAs em amostras de sangue periférico e tecidos coletados de pacientes que apresentem diferentes graus de glioma submetidos à biópsia;
8. Isolar e caracterizar miRNAs presentes nas VEs, no sangue periférico e no sobrenadante das culturas primárias de GBM, como possíveis biomarcadores para esta doença.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não foram feitas alterações no texto dos riscos e dos benefícios da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de pesquisa a ser desenvolvida com fragmentos de tumor e amostras de sangue de pacientes com glioma. Os dados de sangue dos pacientes serão comparados com os de sangue de indivíduos saudáveis. O cálculo do número amostral da pesquisa resultou em um total de 60 participantes, 15 indivíduos/grupo experimental (glioma dos tipos II, III e IV, e controles saudáveis).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Em atendimento à solicitação, os pesquisadores excluíram "estilo de vida" no TCLE paciente. O novo texto é o que segue: "Além disso, iremos aplicar um questionário com algumas questões relacionadas ao seu histórico médico. Esse questionário será aplicado pela responsável pelo estudo, imediatamente após a assinatura desse termo (aplicado no GHC), e terá a duração de cerca de 10 minutos".

Em atendimento à solicitação, os pesquisadores anexaram modelo de questionário onde foi excluída a solicitação de nome, endereço e número de telefone de contato do paciente.

**Recomendações:**

Recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa quanto aos aspectos éticos.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Os pesquisadores atenderam às solicitações. Assim, recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa quanto aos aspectos éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE  
PESQUISA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO GRANDE DO  
SUL / PROPESQ & UFRGS



Continuação do Parecer: 3.986.203

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 23 de Abril de 2020

---

Assinado por:  
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA  
(Coordenador(a))

## Anexo II – Parecer Consubstanciado CEP/GHC

HOSPITAL NOSSA SENHORA  
DA CONCEIÇÃO - GRUPO  
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Investigação do papel do sistema purinérgico e de vesículas extracelulares na imunomodulação e progressão tumoral em pacientes com glioma

**Pesquisador:** FABRICIO FIGUEIRO

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 24997119.8.3002.5530

**Instituição Proponente:** HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEICAO SA

**Patrocinador Principal:** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.418.814

**Apresentação do Projeto:**

RESUMO

O glioblastoma é o mais maligno dos tumores gliais, está associado a uma pequena sobrevida e é caracterizado por heterogeneidade histológica intratumoral, infiltração difusa e proliferação celular incontrolada. Essa proliferação tumoral é dependente de uma rede complexa de fatores que culminam em imunossupressão no microambiente tumoral, o qual é composto por uma variedade de células, como os linfócitos e no qual as interações entre os elementos que o compõem são decisivos na progressão tumoral. Os linfócitos T regulatórios, no câncer, contribuem para um ambiente imunossuprimido, por inibir a ativação de linfócitos T efetores e células NK, podendo favorecer o desenvolvimento neoplásico. Estudos recentes mostram que linfócitos T e B regulatórios são capazes de produzir AMP e adenosina, pela presença das enzimas NTPDase1/CD39 e ecto-5'-nucleotidase/CD73 presentes na membrana plasmática, as quais foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos T efetores. O microambiente tumoral também pode ser modulado pelas vesículas extracelulares (VEs). As VEs derivados de tumores são sistemas eficientes para a transferência in vivo de sinais "cross-talk", apresentando múltiplas moléculas bioativas associadas que sugerem que eles apresentem um papel central na geração e modulação do microambiente tumoral. Nesse âmbito, crescentes evidências relacionam miRNAs presentes nas

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC  
Bairro: CRISTO REDENTOR CEP: 91.350-200  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3357-2805 E-mail: cep-ghc@ghc.com.br

Continuação do Parecer: 4.418.814

VEs na comunicação entre células tumorais e não tumorais, alterando o fenótipo e regulando a expressão gênica.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### Objetivo Geral

Investigar o papel do sistema purinérgico e de vesículas extracelulares na imunomodulação e progressão tumoral em pacientes com glioma.

##### 2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar o sistema purinérgico nos diferentes graus de glioma (II, III, IV);
2. Caracterizar o sangue periférico e o microambiente tumoral nos diferentes graus de glioma quanto a presença de linfócitos B e T e células NK;
3. Estabelecer cultura primária dos tumores;
4. Avaliar a ativação de linfócitos B e T periféricos após a incubação com VEs derivadas de sangue periférico de pacientes com glioma ou cultura primária de células de GBM, na presença ou não de inibidor da enzima CD73;
5. Isolar as VEs presentes no sangue periférico de pacientes com GBM;
6. Caracterizar as VEs quanto à expressão dos marcadores clássicos e purinérgicos;
7. Quantificar a expressão dos miRNAs em amostras de sangue periférico e tecidos coletados de pacientes que apresentem diferentes graus de glioma submetidos à biópsia;
8. Isolar e caracterizar miRNAs presentes nas VEs, no sangue periférico e no sobrenadante das culturas primárias de GBM, como possíveis biomarcadores para esta doença.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### QUAIS OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO?

Ao participar do nosso estudo você pode auxiliar os pesquisadores a melhorar os conhecimentos sobre os tumores cerebrais. Os incômodos que podem ser sentidos são os relacionados apenas a coleta do sangue, com possibilidade de surgir hematomas ou dor local. No caso da coleta dos fragmentos de tumor, esta será realizada durante a cirurgia, não gerando incômodos adicionais. Os possíveis riscos à saúde física e mental são mínimos.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Emenda ao protocolo foi gerada para responder a questionamentos e pendências do CEP-GHC.

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC  
Bairro: CRISTO REDENTOR CEP: 91.350-200  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3357-2805 E-mail: cep-ghc@ghc.com.br

Continuação do Parecer: 4.418.814

Foram atualizados:

1. Exclusão do "estilo de vida" no TCLE;
2. Foram removidas as informações referentes ao nome, endereço e telefone do paciente do questionário, constando apenas o número do caso como forma de identificação.

Além disso o cronograma foi ampliado, atualização do item "divulgação dos resultados", bem como foi apresentado termo de compromisso de entrega de relatórios periódicos atualizados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Recomendações:**

-

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Emenda aprovada. Estudo já havia sido aprovado pelo CEP-GHC.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 24 de Novembro de 2020

---

Assinado por:

**Daniel Demétrio Faustino da Silva**  
(Coordenador(a))

## **Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo “Investigação do papel do sistema purinérgico e de vesículas extracelulares na imunomodulação e progressão tumoral em pacientes com glioma”. Este estudo objetiva entender melhor sobre a participação do sistema purinérgico e do sistema imune, bem como de vesículas extracelulares no glioma, buscando biomarcadores capazes de monitorar a progressão e recorrência da doença.

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que apresentam como característica comum o crescimento desordenado de células, as quais tendem ser agressivas e incontroláveis. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Os tumores do sistema nervoso central (SNC) devem-se ao crescimento de células anormais nos tecidos do cérebro e da medula espinhal. Os gliomas são os tumores do SNC mais comuns em adultos.

Antes de consentir com sua participação, solicitamos que você leia as informações contidas neste termo de consentimento.

#### **1. QUAL O OBJETIVO PRINCIPAL DO ESTUDO?**

O objetivo principal do estudo é investigar o papel do sistema purinérgico, sistema imune e das vesículas extracelulares na progressão tumoral em pacientes com glioma submetidos a cirurgia de ressecção, bem como a busca por biomarcadores que forneçam dados a respeito de progressão e prognóstico da doença.

#### **2. COMO SERÁ REALIZADO O ESTUDO E QUAL A MINHA PARTICIPAÇÃO?**

Sua participação nesse estudo começará no dia de hoje e se encerrará em, no máximo, três anos, não excedendo o máximo de 5 coletas de sangue e coletas de biópsias de tumor retirado durante procedimento cirúrgico. Também pedimos sua autorização para consultar seu prontuário para coleta de dados clínicos, laboratoriais e sócio demográficos.

Além disso, iremos aplicar um questionário com algumas questões relacionadas ao seu histórico médico. Esse questionário será aplicado pela responsável pelo estudo, imediatamente após a assinatura desse termo (aplicado no GHC), e terá a duração de cerca de 10 minutos.

O estudo será feito da seguinte maneira:

- Pacientes diagnosticados com tumor cerebral terão um fragmento de tumor coletado durante a realização do procedimento cirúrgico. Caso o paciente seja submetido a uma nova cirurgia de retirada do tumor, um novo fragmento será coletado. Serão coletadas amostras de sangue (5 - 10 mL cada coleta) antes da cirurgia e ao longo da realização do tratamento. Essas amostras serão obtidas por ocasião das consultas quando o médico solicitar exames de sangue, em que será coletado um tubo a mais para a realização dos exames. As coletas de sangue serão realizadas pela equipe de Grupo Hospitalar Conceição. Os fragmentos de tumor e as amostras de sangue serão enviados para análise patológica.

#### **3. QUAIS OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO?**

Ao participar do nosso estudo você pode auxiliar os pesquisadores a melhorar os conhecimentos sobre os tumores cerebrais. Os incômodos que podem ser sentidos são os relacionados apenas a coleta do sangue, com possibilidade de surgir hematomas ou dor local. No caso da coleta dos fragmentos de tumor, esta será realizada durante a cirurgia, não gerando incômodos adicionais. Os possíveis riscos à saúde física e mental são mínimos.

#### **4. QUEM TERÁ ACESSO ÀS INFORMAÇÕES DESSE ESTUDO?**

Os dados dos questionários e os resultados individuais são confidenciais e não poderão ser utilizadas para outros objetivos que não estejam descritos neste termo. Os resultados deste estudo deverão ser publicados, porém a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento. As amostras biológicas obtidas a partir de sua participação serão armazenadas em um banco e identificadas com um código numérico que manterá o seu anonimato. As amostras, após serem coletadas, serão encaminhadas ao Departamento de Bioquímica da UFRGS onde serão realizados os experimentos. Para tal, o sangue será processado imediatamente e o fragmento tumoral será congelado em um freezer -80°C. Imediatamente após a coleta, essas amostras serão identificadas com um código numérico para manter o anonimato dos pacientes. O encaminhamento, processamento, armazenamento e identificação das amostras será realizado pela aluna responsável pelo estudo. Essas amostras formarão um banco de amostras, as quais, além de serem utilizadas para a obtenção de dados para o presente estudo, também poderão ser utilizadas para estudos futuros (os quais novamente passarão por aprovação pelos comitês de ética das instituições participantes). Esse banco será mantido no freezer -80°C do departamento de bioquímica da UFRGS, sob a responsabilidade da pesquisadora responsável pelo estudo e, assim como todas as amostras desse estudo, essas serão identificadas com um código numérico para manter o anonimato dos pacientes.

As informações obtidas através da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e a divulgação das informações mencionadas só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto. Somente os pesquisadores poderão identificar a origem das amostras. Esse projeto foi aprovado pelos comitês de ética da UFRGS e do Grupo Hospitalar Conceição e poderão ter acesso aos dados da pesquisa para poder assegurar que seus direitos como paciente estão sendo protegidos.

**5. QUAIS SÃO AS COMPENSAÇÕES DA SUA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?**

Este estudo não inclui a administração de medicamentos, apenas a coleta de tecido tumoral a partir das biópsias e de sangue para exames. Não haverá custos para os participantes do estudo. Você também não receberá nenhum pagamento pela participação no trabalho.

**6. PODEREI DESISTIR DE PARTICIPAR DO ESTUDO?**

A qualquer momento, você poderá recusar a continuar participando do estudo e, também, retirar este consentimento sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo. Isto não influenciará o andamento do estudo e seus resultados futuramente, nem o tratamento oferecido pela equipe responsável.

**7. A QUEM DEVO ME DIRIGIR PARA MAIORES INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA?**

Sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo pelo pesquisador responsável cujos meios de contato encontram-se no final deste termo.

Assim, após ler e receber todos os esclarecimentos solicitados, você poderá assinar e irá receber uma via do presente Termo. Esse termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Favor preencher abaixo se concordar em participar do estudo:

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre todos os procedimentos que serão feitos e os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei solicitar novas informações a qualquer momento. Além disso, sei que as informações obtidas durante o estudo são confidenciais e privadas e que os fragmentos obtidos da ressecção tumoral irão compor um banco de amostras, e que poderei me retirar do estudo a qualquer momento.

**ASSINATURAS**

Você aceita que os fragmentos obtidos da ressecção tumoral sejam depositados no banco de amostras?

Sim ( ) Não ( )



Sua assinatura abaixo demonstra que você recebeu e leu este termo, entendeu todas as informações relacionadas ao estudo proposto, esclareceu suas dúvidas e concordou com a sua participação em nosso estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome do paciente (ou responsável)

Se responsável: ( ) mãe ( ) pai ( ) outros: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Contatos: ( ) \_\_\_\_\_  
( ) \_\_\_\_\_

**Responsáveis pela pesquisa:**

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. Fabrício Figueiró e Juliete Nathali Scholl

Local: UFRGS - Departamento de Bioquímica, ICBS. Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, laboratório 22

Telefone para contato: (51) 3308-5553/5554

E-mail: [Fabriciofigueiro@gmail.com](mailto:Fabriciofigueiro@gmail.com); [Juliete.scholl@gmail.com](mailto:Juliete.scholl@gmail.com)

Instituição: Grupo Hospitalar Conceição (GHC)

Local: Avenida Francisco Trein, 596 – Cristo Redentor, Porto Alegre – RS

Pesquisador/médico responsável: Dr. Paulo Valdeci Worm

Telefone para contato: (51) 99671-4189

**Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS:**

Local: Av. Paulo Gama, 110, Sala 311 - Prédio Anexo I da Reitoria - Campus Centro. Porto Alegre/RS  
- CEP: 90040-060

Telefone para contato: +55 51 3308 3738

E-mail: [etica@propesq.ufrgs.br](mailto:etica@propesq.ufrgs.br)

**Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição:**

Local: Av. Francisco Trein, 326 - Bairro Cristo Redentor. Porto Alegre - RS - CEP 91.350-200

Telefone para contato: (51) 3357-2285

E-mail: [ensinoepesquisa@ghc.com.br](mailto:ensinoepesquisa@ghc.com.br)

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

#### Anexo IV - Artigos científicos publicados em coautoria durante o período do doutorado

1. Bergamin, L.S.; Capece, M.; Salaro, E.; Sarti, A.C.; Falzoni, S.; Pereira, M.S.L.; De Bastiani, M.A.; **Scholl, J.N.**; Battastini, A.M.O.; Di Virgilio, F. Role of the P2X7 receptor in in vitro and in vivo glioma tumor growth. *Oncotarget*, v. 10, p. 4840-4856, 2019.
2. Gubert, C.; Andrejew, R.; Leite, C.E.; Moritz, C.E.J.; **Scholl, J.N.**; Figueiro, F.; Kapczinski, F.; Da Silva Magalhães, P.V.; Battastini, A.M.O. P2X7 Purinergic Receptor Is Involved in the Pathophysiology of Mania: A Preclinical Study. *Molecular Neurobiology*, v. 57, p. 1347-1360, 2020.
3. Azambuja, J. H.; Schuh, R. S.; Michels, L. R.; Iser, I. C.; Beckenkamp, L. R.; Roliano, G. G.; Lenz, G. S.; **Scholl, J. N.**; Sévigny, J.; Wink, M. R.; Stefani, M. A.; Battastini, A. M. O.; Figueiró, F.; Teixeira, H. F.; Braganhol, E. Blockade of CD73 delays glioblastoma growth by modulating the immune environment. *CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY*, v. ,, p. ,, 2020.
4. Fachel, F.N.S.; Michels, L.R.; Azambuja, J.H.; Lenz, G.S.; Gelsleichter, N.E.; Endres, M.; **Scholl, J.N.**; Schuh, R.S.; Barschak, A.G.; Figueiró, F.; Bassani, V.L.; Henriques, A.T.; Koester, L.S.; Teixeira, H.F.; Braganhol, E. Chitosan-coated rosmarinic acid nanoemulsion nasal administration protects against LPS-induced memory deficit, neuroinflammation, and oxidative stress in Wistar rats. *Neurochemistry International*, v. 141, p. 104875, 2020.
5. Doneda, E.; Bianchi, S.E.; Pittol, V.; Kreutz, T.; **Scholl, J.N.**; Ibañez, I.L.; Bracalente, C.; Durán, H.; Figueiró, F.; Klamt, F.; Bassani, V.L. 3-O-Methylquercetin from *Achyrocline satureioides*-cytotoxic activity against A375-derived human melanoma cell lines and its incorporation into cyclodextrins-hydrogels for topical administration. *Drug Delivery and Translational Research*, v.11(5), 2021.
6. Moritz, C.E.J.; Boeno, F.P.; Vieira, A.F.; Munhoz, S.V.; **Scholl, J.N.**; Dias, A.F.; Pizzato, P.R.; Figueiró, F.; Battastini, A.M.O; Reischak'Oliveira, A. Acute moderate-intensity aerobic exercise promotes purinergic and inflammatory responses in sedentary, overweight and physically active subjects. *Experimental Physiology*, v.106(3), 2021.
7. Dias, A.F; **Scholl, J.N.**; Moritz, C.E.J.; Kagami, L.P.; Das Neves, G.M.; Eifler-Lima, V.L.; Cruz-López, O.; Conejo-García, A.; Sévigny, J.; Battastini, A.M.O.; Campos, J.M.; Figueiró, F. New insights into cytotoxic mechanisms of bozepinib against glioblastoma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 162, p. 105823, 2021..
8. Alvorcem, L.M.; Britto, R.; Cecatto, C.; Roginski, A.C.; Rohden, F.; **Scholl, J.N.**; Guma, F.C.R.; Figueiró, F.; Amaral, A.U.; Zanatta, G.; Seminotti, B.; Wajner, M.; Leipnitz, G. Ethylmalonic acid impairs bioenergetics by disturbing succinate and glutamate oxidation and induces mitochondrial permeability transition pore opening in rat cerebellum. *Journal of Neurochemistry*, v. -, p. jnc.15363, 2021..

9. Lopes, D.V.; Dias, A.F.; Silva, L.F.L.; **Scholl, J.N.**; Sévigny, J.; Battastini, A.M.O.; Figueiró, F. Influence of NSAIDs and methotrexate on CD73 expression and glioma cell growth. *Purinergic Signalling*, v.17, p.273-284, 2021.
10. Costa, L.R.; Souza, A.K.Y. De; **Scholl, J.N.**; Figueiró, F.; Battastini, A.M.O.; Jaques, J.A. Dos Santos; Zanoelo, F.F. Biochemical characterization of adenosine deaminase (CD26; EC 3.5.4.4) activity in human lymphocyte-rich peripheral blood mononuclear cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research (on line)*, v. 54, p. xxx, 2021.
11. Dallemole, D.R.; Terroso, T.; Alves, A.C.S.; **Scholl, J.N.**; Onzi, G.R.; Cé, R.; Paese, K.; Battastini, A.M.O.; Guterres, S.S.; Figueiró, F.; Pohlmann, A.R. Nanoformulation Shows Cytotoxicity against Glioblastoma Cell Lines and Antiangiogenic Activity in Chicken Chorioallantoic Membrane. *Pharmaceutics*, v. 13, p. 862, 2021.
12. Alves, A.C.S.; Lavayen, V., Dias, A.F.; Bruinsmann, F.A.; **Scholl, J.N.**; Cé, R.; Visioli, F.; Battastini, A.M.O.; Guterres, S.S.; Figueiró, F.; Pohlmann, A.R. EGFRvIII peptide nanocapsules and bevacizumab nanocapsules: a nose-to-brain multitarget approach against glioblastoma. *Nanomedicine*, vol.16, n.20, 2021.
13. Scheffel, T.B.; Rockenbach, L.; Cruz, F.F.; Kist, L.W.; Bogo, M.R.; **Scholl, J.N.**; Figueiró, F.; Lenz, G.; Morrone, F.B. Inhibition of ATP hydrolysis as a key regulator of temozolomide resistance and migratory phenotype of glioblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 601, p. 24-30, 2022.
14. Pietrobon, A.J.; Andrejew, R.; Custódio, R.W.A.; Oliveira, L.M.; **Scholl, J.N.**; Teixeira, F.M.E.; De Brito, C.A.; Glaser, T.; Kazmierski, J.; Goffinet, C.; Turdo, A.C.; Yendo, T.; Aoki, V.; Figueiró, F.; Battastini, A.M.O.; Ulrich, H.; Benard, G.; Duarte, A.J.S.; Sato, M.N. Dysfunctional purinergic signaling correlates with disease severity in COVID-19 patients. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. -, 2022.
15. Nunes, V.B.S.; Dias, C.K.; **Scholl, J.N.**; SantAna, A.N.; Dias, A.F.; Farias, M.G.; Alegretti, A.P.; Sosnoski, M.; Daudt, L.E.; Michalowski, M.B.; Battastini, A.M.O; Paz, A.A.; Figueiró, F. Lymphocytes from B-acute lymphoblastic leukemia patients present differential regulation of the adenosinergic axis depending on risk stratification. *Discover Oncology*, 30;13(1):143, 2022.