

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

Fabiana de Mattos Manica

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

Porto Alegre

2021

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

Fabiana de Mattos Manica

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

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

Porto Alegre

2021

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

PARTE I	6
RESUMO.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Tumores do sistema nervoso central	11
1.2 Glioma.....	12
1.3 Glioblastoma	14
1.4 Tratamentos Padrão.....	16
1.5 Tratamentos não padrão e inovadores.....	19
1.6 Sistema Purinérgico	22
1.7 Ecto-5'-nucleotidase e o Câncer.....	26
1.8 Ecto-5'-nucleotidase e sua função protéica.....	27
1.9 Ecto-5'-nucleotidase e sua função enzimática na resistência a drogas.....	30
1.10 Cultivo celular utilizando células C6 de glioma de rato	32
2. OBJETIVO.....	34
PARTE II	36
3. RESULTADOS	37
CAPÍTULO I	37
CAPÍTULO II	68
PARTE III	87
4. DISCUSSÃO GERAL	88
5. CONCLUSÃO.....	95
6. PERSPECTIVAS.....	96
7. REFERÊNCIAS.....	97
8. ANEXOS	111

PARTE I

RESUMO

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

ABSTRACT

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

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA - ecto-adenosina desaminase

ADP - adenosina difosfato

AKT – Proteína quinase B

AMP - adenosina monofosfato

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

APCP - 5'- α,β -metileno-ADP

ATP - adenosina trifosfato

CTLA4 - Proteína-4 Associada a Linfócitos T Citotóxicos

e5NT/CD73 – ecto-5'-nucleotidase/CD73

EGFR - receptor do fator de crescimento epidermal

E-NPPs - ecto- nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

E-NTPDase - ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

FDA - Food and Drug Administration

GBM – Glioblastoma

GPI – glicosilfosfatidilinositol

IDH - Isocitrato desidrogenase

MAPK - proteína cinase ativada por mitógenos

MEC – matriz extracelular

MGMT - O6-metilguanina-DNA metil-transferase

MRP1 - proteína associada à resistência a multidrogas 1

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

MTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

OMS – organização mundial da saúde

P1 - receptor purinérgico metabotrópico para adenosina

P2X - receptor purinérgico ionotrópico

P2Y - receptor purinérgico metabotrópico

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

PD-1 - Proteína de Morte Celular Programada 1

PDL-1 Ligante de Morte Programada 1

PDGFRA - Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PTEN - homólogo fosfatase e tensina deletado do cromossomo 10

SNC – sistema nervoso central

SUS – Sistema único de saúde

TEP1 – Componente 1 da telomerase

TMZ – Temozolamida

TTF - *Tumour-treating fields*

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumores do sistema nervoso central

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

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

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

1.2 Glioma

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

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

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

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

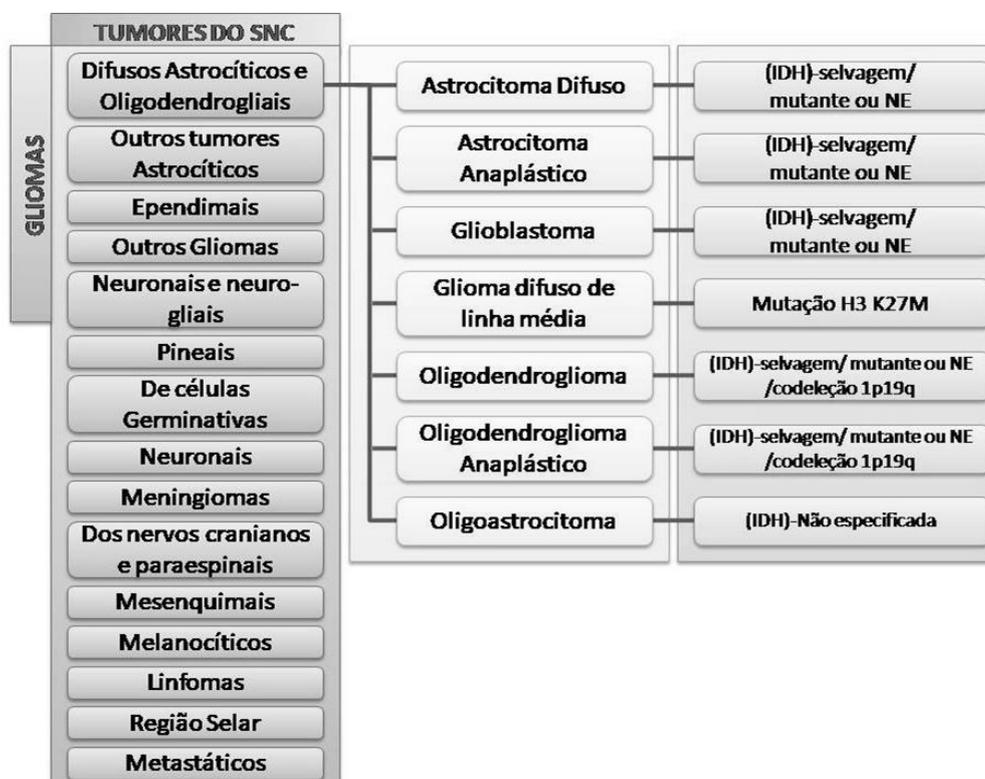


Figura 1: Classificação dos tumores do SNC e subdivisões dos gliomas difusos astrocíticos e oligodendrogliais, com suas respectivas classificações, segundo a classificação da OMS de 2016. Esquema de autoria própria.

1.3 Glioblastoma

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

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

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

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

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

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

1.4 Tratamentos Padrão

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

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

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

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

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

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

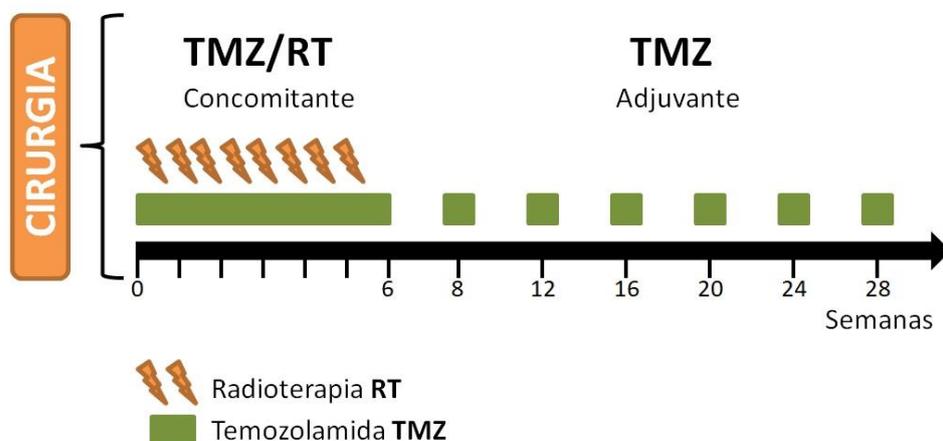


Figura 2: Esquema de tratamento padrão para pacientes recém diagnosticados com GMB. Após a cirurgia, a radioterapia é iniciada concomitantemente com a TMZ por 6 semanas, após é iniciada a administração de TMZ de forma adjuvante por 5 dias, com intervalo de 28 dias por 6 ciclos completos. (Adaptado de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

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

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

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

1.5 Tratamentos não padrão e inovadores

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6 Sistema Purinérgico

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

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

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

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

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

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

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

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

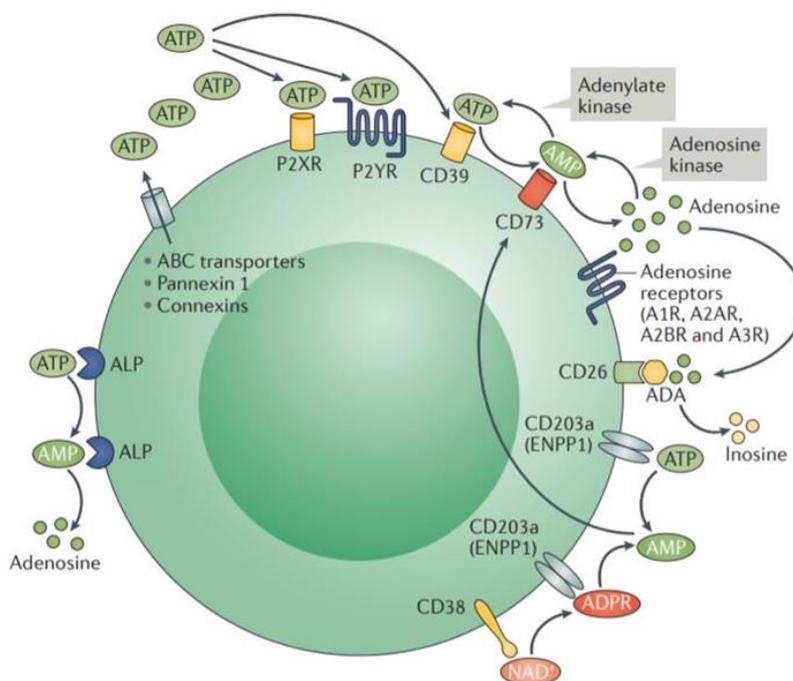


Figura3: Visão geral da sinalização purinérgica. O sistema purinérgico é composto pelos receptores P_{2X} , P_{2Y} e P_1 , e pela família das ecto-nucleotidases que está representada pela NTPDase-1 (CD39), ENPPs, Fosfatase Alcalina (ALP) e a ecto-5'-nucleotidase (CD73). O ATP pode ser liberado da célula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

Essas moléculas sinalizadoras, geradas pelas ecto-nucleotidases, têm seus efeitos mediados através da interação com diferentes receptores presentes na membrana das células, denominados purinoreceptores (Burnstock, 2007). Cada receptor possui uma sensibilidade específica aos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Existem caracterizadas duas famílias de receptores, os receptores P_1 e P_2 . Os receptores P_1 são ligantes de adenosina e são divididos em 4 grupos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , todos acoplados à proteínas G. Estes receptores diferem entre si pela concentração de adenosina necessária para ativar cada receptor, sendo A_1 e A_{2A} , de alta afinidade, ativados em baixas concentrações (K_d 70 e 150nM,

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

Os receptores P2 são sensíveis principalmente ao ATP/ADP e são subdivididos em duas grandes famílias: P2X: canais iônicos dependentes de ligante (receptores ionotrópicos) e P2Y: metabotrópicos, acoplados a proteínas G. Os receptores P2X são sensíveis ao ATP e até o momento foram identificados sete exemplares dessa família (P2X₁ - P2X₇). Os P2Y são sensíveis à ATP, ADP e UTP e foram identificados oito membros da família dos receptores P2Y (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) (Zimmermann, 2006 e Burnstock 2007).

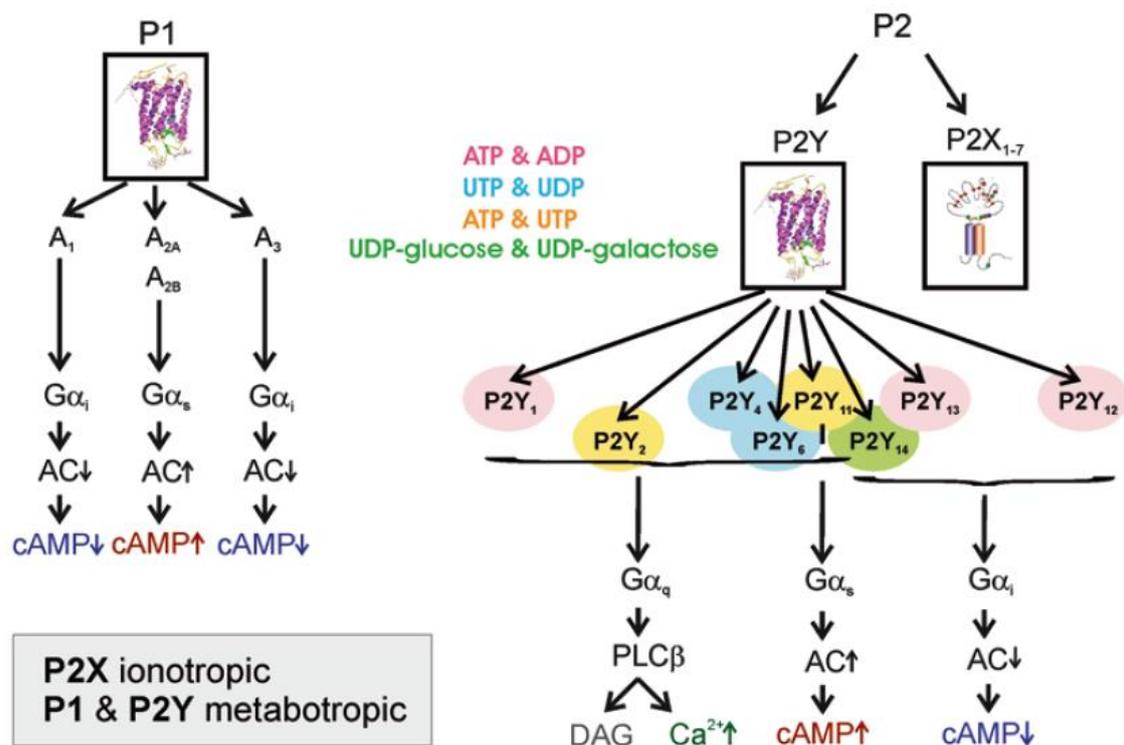


Figura 4: Receptores Purinérgicos P1 e P2, com ênfase no subtipo de proteína G acoplada aos receptores metabotrópicos. (Adaptado de Glioma Signaling 2ª ed, 2020)

1.7 Ecto-5'-nucleotidase e o Câncer

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

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

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

1.8 Ecto-5'-nucleotidase e sua função protéica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.10 Cultivo celular utilizando células C6 de glioma de rato

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

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

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

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

2. OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

6. Verificar as concentrações de APCP necessárias para inibir a atividade da e5NT/CD73 por pelo menos 24 nas células U138 e U251;
7. Avaliar se a inibição da e5NT/CD73 modifica o perfil de sensibilidade à TMZ nas linhagens U138 e U251 em avaliações de curto e longo prazo;

4. DISCUSSÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. CONCLUSÃO

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

6. PERSPECTIVAS

CAPÍTULO I

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

CAPÍTULO II

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

7. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Chan KM, Delfert D, Junger KD. (1968) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem*; v.157, p.375-380.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. ANEXOS



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

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

Projeto: 08-578

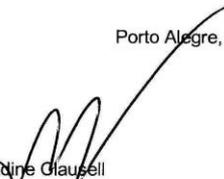
Pesquisadores:

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

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

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

Porto Alegre, 02 de dezembro de 2008.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA