

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

**Envolvimento do Sistema Purinérgico, da Enzima Ciclooxygenase 2 e
Sistema Imune no Desenvolvimento e Progressão de Glioblastoma
Multiforme e Novas Alternativas Terapêuticas para esse Tipo Tumoral**

LETÍCIA SCUSSEL BERGAMIN

Orientadora: Dra. Ana Maria Oliveira Battastini

**Porto Alegre
2016**

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

**Envolvimento do Sistema Purinérgico, da Enzima Ciclooxygenase 2 e
Sistema Imune no Desenvolvimento e Progressão de Glioblastoma
Multiforme e Novas Alternativas Terapêuticas para esse Tipo Tumoral**

LETÍCIA SCUSSEL BERGAMIN

Orientadora: Dra. Ana Maria Oliveira Battastini

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

**Porto Alegre
2016**

DEDICO

Aos meus maiores incentivadores e torcedores:

Meus amados pais, Eugenio e Vani

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Teixeira de Andrade

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eugenio e Vani, por jamais medirem esforços para realizarem os meus sonhos, por tornarem possível e mais fácil essa longa caminhada de estudos em Porto Alegre. Obrigada pelo apoio e amor incondicionais todos os dias. Obrigada, simplesmente, por vocês existirem em minha vida. Tenho muito orgulho de vocês e vocês são meus maiores exemplos! Sem vocês, eu nada seria! Amo vocês!

Ao meu irmão, Jorge, pelo seu coração enorme, sempre me compreendendo tão bem! Contigo aprendi a ser mais corajosa e a ver a vida com outros olhos, olhos de curiosidade, tu despertaste em mim o desejo de descobrir o mundo e viver tudo de belo que ele tem a oferecer.

Ao Marco, que mesmo a quilômetros de distância, faz meus dias mais e mais felizes. O presente mais lindo que a Itália poderia me dar! A pessoa que todo dia faz com que eu sorria!

Ao Augusto, meu sobrinho, que ainda é tão pequeno, mas já desperta em mim um gigantesco amor e que me transmite uma paz infinita!

À Paula, minha cunhada, uma pessoa honesta, querida e que torna a vida das pessoas a sua volta mais leve.

A todos meus tios e tias, em especial ao Tio Luli, Tia Zê, Tia Rose e tia Cláudia primos, primas, vô Guerino e vó Ignez que sempre vibram com minhas conquistas.

Às minhas amigas da escola e da faculdade por sempre estarem por perto quando eu precisei.

À Ana, por todos os anos de orientação e também de amizade. Por acreditar em mim, por acreditar que eu era capaz e me incentivar. Obrigada por ter também me apoiado nos momentos em que o trabalho não andava como eu desejava. És um exemplo de profissional, com a honestidade acima de tudo.

A todos do laboratório 22 que tornam esse laboratório um ótimo ambiente de trabalho, Anna, Dani, Pati, Fabi, Elisa, Carol, César, Lila, Xica e Fabrício. E aos que passaram pelo laboratório 22 e que também foram essenciais Andressa, Fran, Angélica e principalmente ao Rafa Zanin e Eliz.

Ao Professor Francesco Di Virgilio, por ter me recebido carinhosamente em seu laboratório em Ferrara-Itália. Por ter me transmitido tantos novos conhecimentos. Obrigada também a todas as meninas do laboratório: Juani, Paola, Simoneta, Elena Adinolfi, Elena, Elisa, Alessia, Francesca, Marta e principalmente a Marina e Erica.

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

Ao CNPq, CAPES/PDSE (99999.002512/2014-09) pelo apoio financeiro.

A Deus, por estar sempre do meu lado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS E TABELA.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Gliomas.....	2
1.1.1. Glioblastoma Multiforme.....	3
1.2. Macrófagos.....	6
1.2.1 Macrófagos Associados ao Tumor.....	8
1.3. Sistema Purinérgico.....	10
1.3.1. Nucleotídeos e Nucleosídeos Extracelulares.....	10
1.3.2. Ectonucleotidases.....	12
1.3.3. Receptores Purinérgicos.....	14
1.3.3.1. Receptores do Tipo P1.....	15
1.3.3.2. Receptores do Tipo P2.....	15
1.3.3.3. Receptores P2Y.....	16
1.3.3.4. Receptores P2X.....	16
1.3.3.4.1. Receptor Purinérgico P2X7.....	17
1.3.3.4.1.1. Papel do P2X7 em Câncer.....	19
1.4. Novos Alvos Terapêuticos.....	22
1.4.1. Ciclooxigenase 2.....	22
1.4.2. Ácido Ursólico.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3. CAPÍTULOS.....	30

3.1. Capítulo I.....	31
3.2. Capítulo II.....	42
3.3. Capítulo III.....	52
3.4. Capítulo IV.....	79
3.5. Capítulo V.....	105
4. DISCUSSÃO.....	139
5. CONCLUSÕES.....	153
5.1. Conclusões Gerais.....	154
5.2. Conclusões Específicas.....	154
6. PERSPECTIVAS.....	158
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160
8. ANEXOS.....	176
8.1. Outros Artigos Científicos Publicados Co-Autora Durante o Período do Doutorado.....	177
8.2. Cópia do Certificado de Aprovação do Comitê de Ética para o Desenvolvimento dos Experimentos com o Uso de Animais.....	179
8.3. Instruções das Revistas aos Autores para Submissão de Artigo Científico.....	185
8.3.1. Capítulo III: Purinergic Signalling.....	186
8.3.2. Capítulo IV: European Journal of Pharmacology.....	201
8.3.3. Capítulo V: Journal of Cellular Biochemistry.....	216

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR - Regiões Conservadas da Apirase

ADO – Adenosina

ADP - Adenosina Difosfato

Akt - Proteína Cinase B

AMP - Adenosina Monofosfato

AMPC - Adenosina Monofosfato Cíclico

ATP - Adenosina Trifosfato

Bcl-2 - Linfoma de Células B 2

BzATP-*(2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)Adenosine-5'-Triphosphate Tri(Triethylammonium) Salt)*

COX - Ciclooxygenase

Ecto-5'-NT/CD73 - Ecto-5'-nucleotidase/CD73

EGF - Fator de Crescimento Epidermal

E-NPPs - Ectonucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterases

E-NTPDases - Ectonucleosídeo Trifosfato-Difosfohidrolases

ERK- MAPK Regulada Extracelularmente

GBM - Glioblastoma Multiforme

GM-CSF - Fator de Estimulação de Colônia de Granulócitos e Macrófagos

GPI - Glicosil Fosfatidilinositol

HGF - Fator de Crescimento de Hepatócitos

HIF-1 - Fator 1 Induzido por Hipóxia

ICAM-1- Molécula de Adesão Intercelular

IL - Interleucina-4

INF γ - Interferon Gama

IP3 - Inositol-3-Fosfato

JNK - Proteína Cinase JNK

LPS - Lipopolisacarídeo

MAPK - Proteína Cinase Ativada por Mitógenos

MCP-1/CCL2 - Proteína Quimioatrativa de Monócitos

miR-21 - microRNA 21

MMP-9 - Matriz Metaloproteinase 9

NSAID: Medicamentos Anti-Inflamatórios Não-Esteróides

NFAT - Fator Nuclear de Células T Ativadas

NF-κB - Fator Nuclear Kappa B

NK – Células *Natural Killer*

NLRP3 - *NOD-like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3*

NO - Óxido Nítrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

P1 - Receptor Purinérgico do Tipo P1

P2 - Receptor Purinérgico do Tipo P2

PDCD4 - Proteína de Morte Celular Programada 4

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PGE2 - Prostaglandina E2

PGH2 - Prostaglandina H2

PI3K - Fosfatidilinositol 3-Cinase

PKC - Proteína Cinase C

PLC - Fosfolipase C

PTEN - Homólogo Fosfatase e Tensina Deletado do Cromossomo 10

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeos Simples

STAT3 - Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição

TAM - Macrófagos Associados ao Tumor (*Tumor Associated Macrophages*)

TGF- β - Fator Beta de Transformação do Crescimento

Th1 - Linfócitos T Auxiliares/*Helper* Tipo 1

Th2 - Linfócitos T Auxiliares/*Helper* Tipo 2

TLR – Receptores *Toll-Like*

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

UA - Ácido Ursólico

UDP - Uridina Difosfato

UTP - Uridina Trifosfato

VEGF - Fator de Crescimento Vascular Endotelial

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Origem dos Subtipos de Glioblastoma Multiforme.....	4
Figura 2: Ações Angiogênicas e Imunossupressoras dos TAM.....	10
Figura 3: Visão Geral do Sistema Purinérgico.....	12
Figura 4: Representação Esquemática do Papel do Receptor Purinérgico P2X7 na Biologia Celular do Câncer.....	20
Tabela 1: Relação entre Grau Tumoral, Tempo de Sobrevivência Média e Características Histológicas.....	3

RESUMO

Glioblastoma multiforme é o tumor maligno mais comum do sistema nervoso central em adultos e a sobrevida média é de apenas 12 a 15 meses após o diagnóstico. Por isso, é extremamente importante desenvolver tratamentos mais eficazes e específicos contra essa neoplasia. A presença do sistema imune, incluindo macrófagos associados ao tumor, promove a proliferação tumoral e está associada com um pior prognóstico em pacientes com essa doença maligna. A sinalização purinérgica e o receptor purinérgico P2X7, um canal iônico, têm sido implicados na progressão de diferentes tipos de tumores tanto *in vitro* como *in vivo*. A ciclooxigenase 2 (COX-2) desempenha um papel importante na regulação da proliferação celular, diferenciação e na tumorigênese. O ácido ursólico é um triterpeno pentacíclico encontrado em uma variedade de plantas e exibe diversas atividades biológicas e farmacológicas. O objetivo dessa tese é verificar a participação do sistema purinérgico, sistema imune e COX-2 no desenvolvimento e progressão do glioblastoma multiforme, e também investigar os efeitos citotóxicos do ácido ursólico. Primeiramente, verificamos que macrófagos expostos ao meio condicionado de glioma (GL-CM) foram modulados para um fenótipo do tipo M2 e houve um aumento da liberação de IL-10, IL-6 e MCP-1. Esses efeitos foram diminuídos na presença de antagonistas dos receptores P2X7 e A_{2A}. Portanto, os resultados apresentados contribuem para o melhor entendimento da interação entre inflamação e câncer e demonstram que os receptores purinérgicos são importantes para a progressão do glioma. Após, analisamos o papel do receptor P2X7 na proliferação de células de glioma. Surpreendentemente, *in vitro*, não se observou nenhuma diferença no crescimento das células quando houve a transfecção com o P2X7. Entretanto, *in vivo*, essas células geraram tumores maiores quando comparado com o controle. Os nossos resultados demonstram que, como em outros tipos de cânceres, o P2X7 tem um papel importante no desenvolvimento e progressão tumoral. Uma vez verificado o importante papel do receptor P2X7 nos macrófagos associados ao tumor e nas células de glioma, investigamos se esse receptor poderia interagir com a enzima COX-2 em células de glioma. Porém, não houve diferença na expressão do P2X7 ou da COX-2 tanto *in vitro* como *in vivo*. E também não houve nenhum efeito adicional entre o antagonista de P2X7 e o inibidor seletivo de COX-2. Esse trabalho fornece evidências de que não há relação entre o P2X7 e COX-2 em células de glioma. Em conclusão, todos esses resultados reforçam a hipótese do envolvimento da sinalização purinérgica na progressão do glioblastoma multiforme e tornam o P2X7 como um interessante alvo terapêutico. Finalmente, também investigamos a possível atividade anticâncer do ácido ursólico contra as células de glioma. Essa molécula foi capaz de diminuir o número de células e induziu parada no ciclo celular. *In vivo*, o ácido ursólico reduziu ligeiramente o tamanho do tumor, mas não alterou as características malignas. Em conclusão, o ácido ursólico pode ser um potencial candidato como adjuvante para o tratamento do glioblastoma multiforme. Em conjunto, todos os resultados apresentados nessa tese indicam possíveis novas abordagens terapêuticas no tratamento e novos conhecimentos em relação a esse maligno câncer cerebral.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme is the most common malignant tumor of central nervous system in adults and the median survival is only 12 to 15 months after diagnosis. Therefore, it is extremely important to develop more effective and specific treatments. The presence of an inflammatory environment, including tumor-associated macrophages, promotes tumor proliferation and is associated with a poor prognosis in patients with this malignancy. Disruption of purinergic signaling has also been implicated in cancer progression. P2X7R is an ion channel receptor, whose participation in tumor progression has been demonstrated in *in vitro* and *in vivo* studies. Cyclooxygenase 2 (COX-2) plays an important role in regulating cell proliferation, differentiation, and tumorigenesis. Ursolic acid is a pentacyclic triterpenoid found in a variety of plants that exhibits several biological and pharmacological activities. The aim of this study is to verify the participation of the purinergic system, immune system and COX-2 in the glioblastoma multiforme development and progression, and also to investigate the anti-proliferative effects of ursolic acid. We first verified that macrophages exposed to glioma conditioned medium (GL-CM) were modulated to an M2-like phenotype and there was an increased IL-10, IL-6 and MCP-1 secretion and these effects were diminished by P2X7 and A_{2A} receptors antagonists. Therefore, the results presented contribute to advancing in the field of cancer-related inflammation and point specific purinergic receptors as targets for glioma progression. After that, we analyzed the role of P2X7 receptor in glioma cell proliferation. Surprisingly, *in vitro*, no difference in cell growth was observed when the cells were transfected with P2X7R but *in vivo* these cells generated larger tumors when compared to the control. Our data demonstrate that, as in other type of cancers, P2X7R has an important role in sustaining the development of glioma. Once verified the important role of P2X7 receptor in tumor-associated macrophages and glioma cells, we verified whether this receptor could interact with the COX-2 enzyme in glioma cells. No differences in mRNA expression of P2X7R or COX-2 were verified both *in vitro* and *in vivo* experiments. And any additional effect with selective P2X7R antagonist and COX-2 inhibitor were observed in *in vitro* and *in vivo* experiments. This work provides evidence that there is no relationship between the P2X7R and COX-2 in glioma. In conclusion, all these results reinforce the hypothesis of purinergic signaling involvement in glioma progression and point to P2X7R as an interesting target for glioma treatment. Finally, we also investigated the potential anticancer activity of ursolic acid against to glioma cells. Ursolic acid decreased the cell number and induced an arrest in the cell cycle in glioma cells. *In vivo*, ursolic acid slightly reduced the glioma tumor size but did not alter the malignant features. In conclusion, the ursolic acid may be a potential candidate as adjuvant for glioblastoma therapy. Taken together, the results presented herein indicate new adjuvant treatment approaches and new knowledge regarding to this deadliest brain tumor.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gliomas

Os tumores que mais acometem o sistema nervoso central são os gliomas e correspondem a cerca de 80% de todas as malignidades do cérebro (Sathornsumetee et al., 2007). A taxa de incidência aumenta com o aumento da idade, sendo a maior prevalência na faixa etária entre 45 a 64 anos (Hess et al., 2004), e mais comum em homens e em caucasianos (Fisher et al., 2007).

A sintomatologia dos pacientes acometidos com glioma é muito inespecífica, sendo que eles podem apresentar dores de cabeça, náuseas, vômitos, confusão mental, mudança de personalidade, perda de memória e convulsões (Wen e Kesari, 2008). A ausência de sintomas neurológicos e baixa idade são fatores que favorecem para um melhor prognóstico (Lacroix et al., 2001). O diagnóstico é realizado através de ressonância magnética ou por tomografia computadorizada (Wen e Kesari, 2008).

A classificação dos gliomas é feita a partir da semelhança morfológica das células tumorais com diferentes tipos de células gliais. Os astrocitomas apresentam semelhança morfológica aos astrócitos, oligodendrogliomas semelhança aos oligodendrócitos e ependinomas semelhança com células ependimais. Existe ainda o oligoastrocitoma que apresenta características tanto dos astrocitomas quanto dos oligodendrogliomas. O subtipo de glioma com a maior incidência é o astrocitoma (Fuller et al., 2007; Louis et al., 2007). A organização mundial da saúde (OMS) classifica os tumores cerebrais de acordo com a sua malignidade em uma escala que varia de I (menos maligno) a IV (mais maligno). Nesse sentido, os astrocitomas são divididos em quatro subgrupos (Sampedro et al., 2011), (Tabela 1):

- Astrocitoma pilocítico (Grau I), considerado de baixo grau, acomete principalmente crianças com idade entre 5 a 15 anos, apresentando baixa capacidade

invasiva e sendo facilmente removidos por ressecção cirúrgica;

- Astrocitoma de baixo grau (Grau II), considerado de baixo grau, apresenta capacidade proliferativa e invasiva moderada. A sobrevida média dos pacientes é entre 5 a 10 anos;

- Astrocitoma Anaplástico (Grau III), considerado de alto grau, pode ser proveniente de tumores recorrentes de neoplasias de baixo grau, apresenta capacidade proliferativa e invasiva maior que os tumores anteriores. Esse tipo tumoral responde inicialmente ao tratamento, entretanto, a recorrência é elevada. A sobrevida média dos pacientes é de 2 a 3 anos;

- Glioblastoma multiforme (GBM) (Grau IV), considerado de alto grau, pacientes com esse tipo tumoral apresentam um péssimo prognóstico, com uma sobrevida média de 9 a 12 meses.

Tabela 1: Relação entre grau tumoral, tempo de sobrevivência média e características histológicas. Adaptado de Maher et al., 2001.

	Astrocitoma de Baixo Grau (Grau I e II) (5-10 anos)	Astrocitoma Anaplástico (Grau III) (2-3 anos)	Glioblastoma Multiforme (Grau IV) (9-12 meses)
Sobrevida			
Proliferação	+/-	++	+++
Angiogênese	-	-	+++
Necrose	-	-	+++

1.1.1. Glioblastoma Multiforme

O Glioblastoma Multiforme (GBM) é o tumor cerebral mais comum e

devastador e, embora o acometimento do glioblastoma multiforme corresponda apenas a 1,5% em relação a outros tumores, intensos estudos têm sido realizados, uma vez que esse câncer sempre leva ao óbito em no máximo 15 meses (Sampedro et al., 2011). Conforme demonstrado na figura 1, o GBM é dividido em dois subtipos: glioblastoma primário, de origem direta de células precursoras gliais, ocorrendo em pacientes com idade superior a 50 anos e glioblastoma secundário, que ocorre em pacientes mais jovens e são provenientes de gliomas de menor grau de malignidade, sendo que os dois tipos de GBM apresentam diferenças moleculares, mas são morfologicamente indistinguíveis (Watanabe et al., 1996).

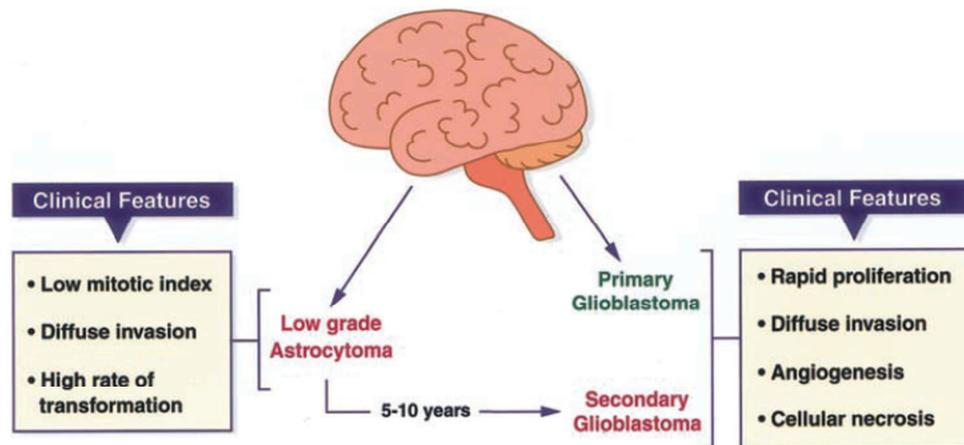


Figura 1: Origem dos Subtipos de Glioblastoma Multiforme. GBM pode ser proveniente de astrocitoma de baixo grau (glioblastoma secundário) ou ser proveniente diretamente de um precursor glial, glioblastoma primário (Maher et al., 2001).

O GBM é caracterizado por rápida proliferação celular, é altamente invasivo, angiogênico e as células apresentam resistência à apoptose (Laws e Shaffrey, 1999). Como características histopatológicas podem ser observados muitos focos de necrose, neovascularização, núcleos mitóticos e grande infiltrado inflamatório (Daí e Holland, 2001; Konopka e Bonni, 2003; Wen e Kesari, 2008). Recentemente foi demonstrado que a progressão do GBM é um processo multifatorial, consistindo de numerosas alterações genéticas e fisiológicas que afetam as interações entre células tumorais,

neurônios, células gliais, sistema vascular e sistema imune (Demuth e Berens, 2004). Hoje já se sabe que esse tumor é constituído de diversos tipos celulares, tais como: células-tronco tumorais, muitas células do sistema imune (células dendríticas, linfócitos T, neutrófilos e, principalmente, macrófagos, essas últimas células podendo corresponder até a 30% da massa do GBM) (Demuth e Berens, 2004; Furnari et al., 2007, Hong et al., 2009), portanto o processo inflamatório é um componente crítico da progressão desse tipo tumoral.

O tratamento de primeira escolha para o GBM é a cirurgia, seguido do uso de radioterapia e quimioterapia (Lacroix et al., 2001). Entretanto, nenhum desses métodos é completamente efetivo, uma vez que a ressecção completa do tumor é limitada devido ao alto grau de invasividade no tecido cerebral normal, tendo, portanto, uma alta recorrência (Sampedro et al., 2011). O uso de quimioterápicos demonstra eficácia limitada, principalmente pela ausência de especificidade terapêutica dos fármacos contra tal neoplasia e da baixa tolerância do tecido normal aos efeitos tóxicos decorrentes da terapia (Mousseau et al., 1993). Além disso, a barreira hematoencefálica limita a entrada dos quimioterápicos no sistema nervoso central, de modo que apenas fármacos lipofílicos (como a temozolomida e nitrosuréias) podem ser utilizados (Mousseau et al., 1993; Newlands et al., 1997). O uso de quimioterápicos também não é tão eficaz devido à grande heterogeneidade celular: esses tumores são compostos de células neoplásicas em proliferação e muitas células do sistema imune e assim, os fármacos tornam-se ineficazes em combater todos esses tipos celulares (Wen e Kesari, 2008; Sampedro et al., 2011).

Em relação à quimioterapia, a temozolomida é o fármaco de primeira escolha. Esse medicamento gera dano ao DNA por causar metilação na posição O6 da guanina, gerando a O6-metilguanina, a qual parecia erroneamente com a timina, levando à parada

do ciclo celular (Newlands et al., 1997). Além disso, esse fármaco pode desencadear morte celular por apoptose ou senescência (Filippi-Chiela et al., 2013). Entretanto, casos de resistência das células de glioma à temozolomida têm sido bastante descritos, principalmente devido à superexpressão de uma enzima removedora do grupamento metila adicionado na base guanina do DNA (Kondo et al., 1995; Hermisson et al., 2006). Além disso, mesmo com a utilização de temozolomida a sobrevida média dos pacientes aumenta em alguns poucos meses (2,4 meses) (Stupp et al., 2009).

Assim, considerando o que foi exposto torna-se de extrema importância investigar novos fármacos bem como novos potenciais alvos terapêuticos. Além disso, considerando a participação do sistema imune na progressão do câncer, também tem se tornado importante investigar as células do sistema imune associadas aos gliomas.

1.2. Macrófagos

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

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

Os macrófagos habitualmente se mantêm em um caráter quiescente e nessa condição eles não liberam citocinas, porém esse tipo celular tem uma extraordinária plasticidade que permite responder eficientemente aos sinais do ambiente e mudar o seu

fenótipo (Gordon, 2003). Assim os macrófagos têm sido classificados de acordo com o seu fenótipo em M1/pró-inflamatório e M2/anti-inflamatório. Esses dois tipos representam os dois extremos de ativação, macrófagos M1 representam um extremo de ativação e os macrófagos M2 o outro extremo de ativação (Gordon, 2003; Mantovani et al., 2004a; Martinez et al., 2008; Mosser e Edwards, 2008).

O fenótipo M1/pró-inflamatório é desencadeado, principalmente, em resposta ao interferon-gama (INF- γ), citocina produzida por linfócitos ativados na forma Th1 e também por células *natural killer* (NK) em conjunto com agonistas de TLRs (*toll-like receptors*), como o lipopolissacarídeo (LPS) (Mantovani et al., 2004a; Gordon, 2007). Quando são ativados para esse fenótipo, os macrófagos atuam como verdadeiros soldados combatendo patógenos de origem bacteriana e viral e eliminando células neoplásicas através da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12 e IL-8/CXCL8) e mediadores como o óxido nítrico (NO) (Sunderkotter et al., 2004; Classen et al., 2009). Em contraste, os macrófagos são ativados para o fenótipo M2/anti-inflamatório, principalmente devido à exposição de IL-4 e/ou IL-13 (Raes et al., 2002; Gordon, 2003; Gordon, 2007) que são citocinas produzidas por linfócitos T, durante a resposta Th2 (Nelms et al., 1999; Varin e Gordon, 2009). Essa via proporciona uma diminuição do processo inflamatório, estimula a angiogênese, estimula a eliminação de restos celulares e corpos apoptóticos, além de contribuir para a deposição de matriz extracelular (Mosser e Edwards, 2008). Esse fenótipo é caracterizado pela alta produção por macrófagos de IL-10 e IL-6, baixa produção de IL-12 e TNF- α , baixa habilidade de atuar como célula apresentadora de antígeno e alta atividade da enzima arginase (Mantovani et al., 2004a; Mantovani et al., 2004b; Martinez et al., 2008).

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

na função que eles exercem na manutenção da homeostasia (Edwards et al., 2006; Mosser e Edwards, 2008). Nessa proposta, os macrófagos seriam classificados em três grupos de acordo com as diferentes funções: macrófagos classicamente ativados (equivalente à ativação clássica, M1/pró-inflamatório), macrófago de regeneração (equivalente ao macrófago alternativo, M2/anti-inflamatório) e macrófagos regulatórios (Mosser e Edwards, 2008). No entanto, como não há consenso até o momento na literatura, a classificação M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa) continuam prevalecendo.

É importante que ocorra um fino balanço entre as diferentes ativações dos macrófagos, pois um aumento da resposta M1/pró-inflamatório pode levar a doenças inflamatórias crônicas, enquanto que um número descontrolado de macrófagos M2/anti-inflamatório pode promover a supressão da resposta imune e desenvolvimento de diversos tipos tumorais (Mantovani et al., 2004 a; Mantovani et al., 2004b; Condeelis et al., 2006). Hoje já se fala muito dos macrófagos associados ao tumor (TAM-do Inglês *tumor associated macrophages*) que são macrófagos com características semelhantes a um fenótipo M2, denominados também como *M2-like* (Murray e Wynn, 2011; Mantovani et al., 2013; Mantovani e Allavena, 2015).

1.2.1. Macrófagos Associados ao Tumor

Macrófagos associados ao tumor (TAM) são a população de leucócitos mais abundantes nos tumores sólidos e geralmente sua presença está relacionada a um pior prognóstico dos pacientes, uma vez que esses macrófagos estão frequentemente relacionados com imunossupressão, angiogênese, invasividade, metástase e uma menor resposta à terapia farmacológica (Bingle et al., 2002; Qian e Pollard, 2010; Ruffel et al., 2012; Ostuni et al., 2015; Mantovani e Allavena, 2015).

Os monócitos e os macrófagos chegam à área tumoral devido à liberação principalmente de MCP-1/CCL2 (proteína quimioatrativa de monócitos), porém fatores como GM-CSF (fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos), VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), fibronectina, fibrinogênio também são capazes de recrutar essas células (Balkwill, 2004; Allavena et al., 2008). Ao chegar ao tumor, diferentes fatores como IL-10, IL-4, IL-13, IL-6 e prostaglandinas, como a PGE₂, podem levar à diferenciação dos macrófagos para um fenótipo do tipo M2 (*M2-like*) (Balkwill e Mantovani, 2001; Coussens e Werb, 2002; David e Kroener, 2011; Mantovani et al., 2013).

A formação de novos vasos sanguíneos é associada com uma maior malignidade dos tumores, e os macrófagos associados ao tumor são os principais responsáveis pela angiogênese no microambiente tumoral, uma vez que secretam substâncias responsáveis por esse processo como VEGF, GM-CSF, TGF- β (fator beta de transformação do crescimento), IL-8/CXCL8 e prostaglandina E₂ (Hu et al., 1993; Pepper, 2001; Raposo et al., 2015). Os TAM geralmente se localizam em áreas necróticas, que são regiões caracterizadas por baixa tensão de oxigênio. Essa localização preferencial é regulada pela produção de HIF-1 (fator 1 induzido por hipóxia), que atrai os macrófagos até as áreas não vascularizadas (Siveen e Kuttan, 2009). Nessas áreas, portanto, os macrófagos auxiliam na formação de novos vasos sanguíneos e como consequência a progressão tumoral (Siveen e Kuttan, 2009).

Os TAM também promovem a proliferação celular através da produção de EGF (fator de crescimento epidermal), PDGF, TGF- β e HGF (fator de crescimento de hepatócitos) (Lewis e Pollard, 2006; Raposo et al., 2015). Entretanto, uma das atividades mais patogênicas dos TAM é a sua capacidade de inibir a resposta imune

anticâncer (Mantovani e Allavena, 2015; Ostuni et al., 2015). Esse efeito é em parte devido à baixa produção pelos macrófagos de IL-12, citocina pró-inflamatória que é muito importante para induzir as ações tumoricidas das células *natural killers*, e ativar os linfócitos T *helper* ao fenótipo Th1 (que combatem o tumor). Além disso, os TAM produzem fatores imunossupressores como IL-10, TGF- β , prostaglandina E2 que recrutam linfócitos T regulatórios. A baixa produção de IL-12 e a alta produção de IL-10 ainda estimulam os linfócitos T a um fenótipo Th2, que reforça o ambiente imunossuprimido (Mantovani e Allavena, 2015; Ostuni et al., 2015) (Figura 2).

Em gliomas, os macrófagos representam grande parte da massa tumoral, portanto, entender o papel dessas células nesse tipo de câncer é de extrema importância.

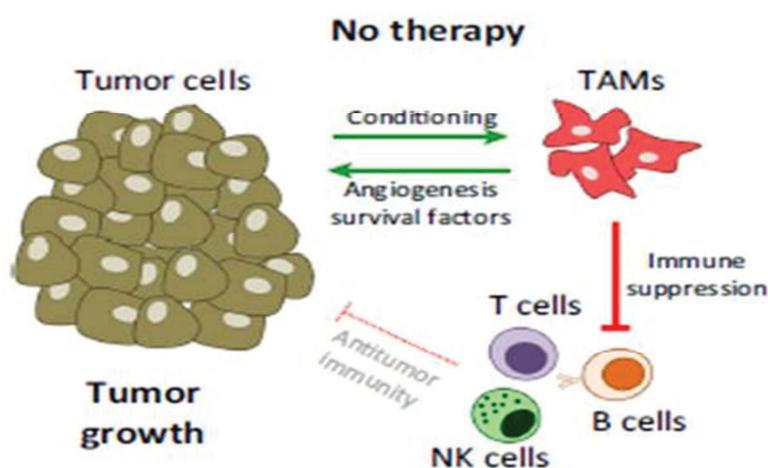


Figura 2: Ações Angiogênicas e Imunossupressoras dos TAM (Ostuni et al., 2015).

1.3. Sistema Purinérgico

1.3.1. Nucleotídeos e Nucleosídeos Extracelulares

A adenosina trifosfato (ATP) está presente em todas as células vivas e o seu papel intracelular no metabolismo energético já é bastante conhecido, sendo responsável por diversos processos que requerem energia como transporte ativo, motilidade celular e biossíntese de moléculas, dentre outros (Bours et al., 2006; Yegutkin, 2008). Em adição

ao seu papel intracelular, o ATP extracelular está envolvido em uma série de processos biológicos como neurotransmissão, contração muscular, vasodilatação, agregação plaquetária, dor e inflamação (Burnstock, 2004; Bours et al., 2006; White e Burnstock, 2006).

A concentração de ATP intracelular é muito alta (3-10 mM), enquanto a concentração fisiológica do ATP extracelular é muito baixa (400-700 nM) (Bours et al., 2006). Esse nucleotídeo pode ser armazenado em vesículas sinápticas e ser liberado por exocitose como um co-transmissor juntamente com outros neurotransmissores como, por exemplo, a acetilcolina e o glutamato (Zimmermann, 1994). Além disso, recentemente foi demonstrado que o ATP pode ser liberado através de panexinas (canais proteicos transmembrana, que conectam o espaço intracelular com o extracelular) ou pelas conexinas (originalmente descritas como proteínas de junções gap, consistindo de dois hemicanais. Os hemicanais isolados podem funcionar como condutores entre o citoplasma e o espaço extracelular, controlando a liberação de ATP das células) (Sabirov e Okada, 2005; Junger et al., 2011; Eltzschig et al., 2012; Idzko et al., 2014). Além disso, em condições de dano celular, hipóxia, estresse mecânico ou morte necrótica, o ATP é liberado para o meio extracelular de uma forma totalmente descontrolada (Verkhrasky et al., 2009; Eltzschig et al., 2012; Idzko et al., 2014).

Um dos produtos da hidrólise extracelular do ATP é a adenosina (ADO), que também tem ações fisiológicas e pode ser considerada outra molécula sinalizadora de dano celular, exercendo em geral ações contrárias as do ATP extracelular (Frantz et al., 2005; Bours et al., 2006). No sistema imune, uma das principais funções da ADO é mediar uma resposta imunossupressora para proteger os tecidos dos ataques promovidos pelas células de defesa durante processos inflamatórios (Sitkovsky e Ohta, 2005). A concentração de adenosina extracelular é em torno de 40-80 nM (Bours et al., 2006), e é

mantida graças à sua degradação a metabólitos ou pela captação através de transportadores bidirecionais (Bours et al., 2006).

Como mostrado na figura 3, os níveis das purinas extracelulares são dinamicamente controlados pelas ectonucleotidases, representadas pela E-NTPDase 1/CD39 e ecto-5'-nucleotidase/CD73, e todos os efeitos biológicos desencadeados pelo ATP e adenosina extracelulares são devido a ligação dessas moléculas aos seus receptores (receptores purinérgicos do tipo P2 (divididos em P2X e P2Y) e P1, respectivamente) (Bours et al., 2006).

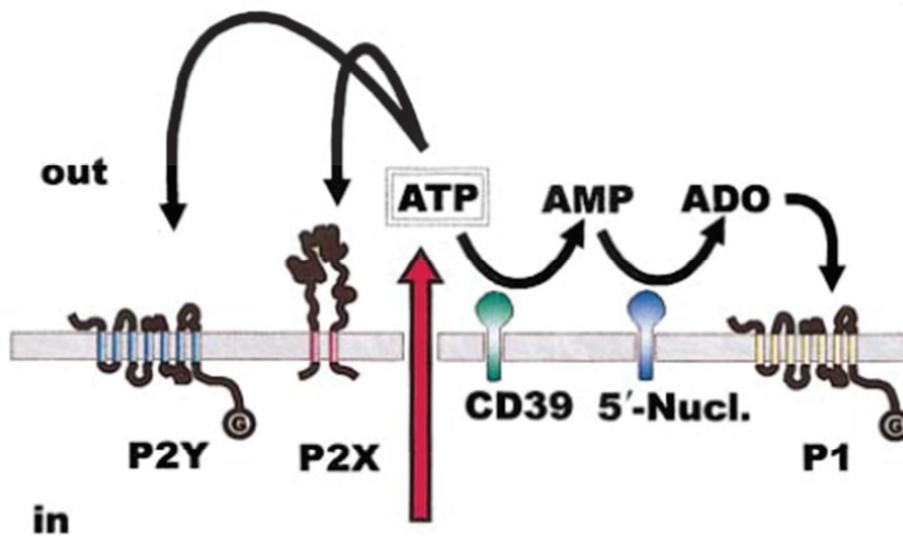


Figura 3: Visão Geral do Sistema Purinérgico. Nessa figura estão presentes os receptores purinérgicos P2X e P2Y (receptores para o ATP) e P1 (receptores da adenosina). Além disso, a enzima E-NTPDase 1/CD39, que hidrolisa o ATP, e a ecto-5'-nucleotidase/CD73, que hidrolisa o AMP até adenosina (Di Virgilio et al., 2001).

1.3.2. Ectonucleotidases

Como mencionado, os efeitos extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeos são regulados pelas ectonucleotidases, que são uma classe de enzimas que incluem a ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases (E-NTPDases), as ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPs), a ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73) e as fosfatases alcalinas (Robson et al., 2006; Zimmermann 2012).

Até o momento já foram clonadas e caracterizadas oito E-NTPDases (1 a 8), sendo que todos os membros da família dessas enzimas apresentam em comum na sua estrutura, cinco domínios denominados de regiões conservadas de apirase (ACR), que estão diretamente envolvidos na atividade catalítica da enzima e/ou na integridade estrutural das mesmas (Handa e Guidotti, 1996). As E-NTPDases 1, 2, 3 e 8 possuem dois domínios transmembrana, N e C-terminal citoplasmático, e são as principais responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos no espaço extracelular. Essas enzimas apresentam diferentes preferências pelos nucleotídeos como substratos. Enquanto a E-NTPDase 1 hidrolisa igualmente nucleosídeos tri- e difosfatados, a E-NTPDase 2 apresenta uma maior preferência para nucleosídeos trifosfatados (especialmente ATP) e as E-NTPDases 3 e 8 apresentam uma leve preferência pelo ATP do que pelo ADP (adenosina difosfato) (Robson et al., 2006; Zimmermann et al., 2012). As E-NTPDases 5 e 6 exibem localização intracelular, não possuem o domínio transmembrana C-terminal e podem ser clivadas próximo ao domínio N-terminal para formar uma enzima solúvel. As E-NTPDases 4 e 7 são localizadas intracelularmente com seus sítio ativos voltados para o lúmen de organelas citoplasmáticas, sendo portanto também consideradas ectoenzimas (Robson et al., 2006; Zimmermann et al., 2012).

O passo final da hidrólise do ATP é a geração de adenosina, a partir de AMP (adenosina monofosfato), pela enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Zimmermann et al., 2012). Essa enzima se encontra ligada à membrana plasmática por meio de uma âncora lipídica de GPI (glicosil fosfatidilinositol) e o sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Zimmermann, 1992; Zimmermann et al., 2012). Além disso, a ecto-5'-nucleotidase/CD73 atua *per se* como um fator de proliferação e está envolvida no controle de crescimento celular, e nas interações entre células e a matriz extracelular,

bem como em mecanismos que levam à migração celular (Airas et al., 1997; Sadej et al., 2006; Sadej et al., 2008; Bavaresco et al., 2008; Cappellari et al., 2012).

Em gliomas, as E-NTPDases e a ecto-5'-nucleotidase/CD73 possuem um papel fundamental na progressão tumoral. Linhagens de glioma apresentam um catabolismo de ATP, ADP e AMP alterados em relação aos astrócitos, uma vez que essas células malignas praticamente não hidrolisam o ATP, o qual pode se acumular e induzir proliferação celular, e hidrolisam muito o AMP, formando adenosina que induz angiogênese e imunossupressão (Wink et al., 2003; Morrone et al., 2005; Bavaresco et al., 2008). A participação do ATP extracelular na progressão de gliomas foi reforçada pelo estudo *in vivo* no trabalho de Morrone e colaboradores. Nesse estudo, foi mostrado que a co-injeção de apirase (uma enzima com características similares da E-NTPDase 1, portanto hidrolisa igualmente ATP e ADP) juntamente com células de glioma em cérebro de rato, reduziu significativamente o tamanho tumoral, bem como as características malignas do mesmo (Morrone et al., 2006). Em contrapartida, em outros dois estudos, quando células de glioma superexpressando a E-NTPDase 2 (enzima que hidrolisa preferencialmente o ATP e pode favorecer o acúmulo de ADP) foram implantadas no cérebro de ratos, observou-se um aumento no tamanho tumoral e modulação da resposta inflamatória sistêmica (Braganhol et al., 2009; Braganhol et al., 2012). Esses resultados completamente opostos (apirase versus E-NTPDase 2) podem estar relacionados com os diferentes produtos da hidrólise do ATP por essas duas enzimas da família das E-NTPDases e consequentemente pela ativação de diferentes receptores purinérgicos, P1 e P2, presentes nas células.

1.3.3. Receptores Purinérgicos

Os purinoreceptores são divididos em receptores do tipo P1 e P2 que são ativados por adenosina e ATP, respectivamente (Illes et al., 2000).

1.3.3.1. Receptores do Tipo P1

Os receptores P1 (metabotrópicos) são receptores sensíveis às variações na concentração de adenosina presente no meio extracelular. São descritos quatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, com distintas propriedades farmacológicas entre si (Ralevic e Burnstock, 1998). Todos eles são acoplados à proteína-G e apresentam sete domínios transmembrana (Ralevic e Burnstock, 1998; Fredholm et al., 2001).

Os receptores P1 são amplamente expressos nas células e apresentam diferentes afinidades pela adenosina, onde os receptores A₁ e A_{2A} demonstram uma maior afinidade pelo nucleosídeo ($EC_{50} < 30$ nm), enquanto que os receptores A₃ e, particularmente, o receptor A_{2B} apresentam baixa afinidade (EC_{50} : 1-20 μ M) (Ham e Evans, 2012).

Os receptores A₁ e A₃ são acoplados a proteínas G_i (proteína G inibitória), as quais exercem funções inibitórias sobre a enzima adenilato ciclase. Já os receptores A_{2A} e A_{2B} são acoplados a proteína G_s (proteína G estimulatória) e ativam a produção de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) (Ralevic e Burnstock, 1998; Abbracchio et al., 2009; Verkhasky et al., 2009).

1.3.3.2. Receptores do Tipo P2

A nomenclatura dos receptores do tipo P2 é baseada na estrutura molecular e foi baseada em critérios de funcionalidade e farmacologia (Di Virgilio et al., 2001). Os receptores P2 são subdivididos em duas classes: P2X (ionotrópicos), ligados a canais iônicos e receptores P2Y (metabotrópicos), acoplados à proteína G. Os receptores P2Y

diferem em sua seletividade para nucleotídeos da adenina (ATP e ADP) e da uracila (UTP e UDP), enquanto que os receptores P2X são ativados somente por ATP. A complexidade dos receptores P2 é aumentada pela formação de homo- e heterodímeros entre receptores (Nakata et al., 2004).

1.3.3.3. Receptores P2Y

Até o momento, já foram identificados oito subtipos de P2Y em células de mamíferos: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14 (White e Burnstock, 2006). Esses receptores diferem entre si pela diferença de afinidade aos seus agonistas (Illes et al., 2000). O P2Y1 e P2Y12 reconhecem mais potentemente o ADP como agonista, e esses receptores medeiam à agregação plaquetária induzida por ADP (Illes et al., 2000; Braganhol et al., 2009; Braganhol et al., 2012). O receptor P2Y2 apresenta afinidade pelo ATP e UTP, enquanto que o ADP e UDP não se ligam a esse receptor. P2Y4 e P2Y6 preferem nucleotídeos de uridina aos de adenina e exibem maior seletividade para o UTP e UDP, respectivamente (Illes et al., 2000). O P2Y11 apresenta uma maior afinidade pelo ATP do que pelo ADP e não apresenta afinidade ao UTP (Di Virgilio et al., 2001). Esses receptores possuem sete domínios transmembrana e são acoplados à proteína G (Illes et al., 2000). Nesse aspecto podem ser divididos em dois grupos: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 que são acoplados a proteína G_q e, portanto, a ativação desses receptores estimula a via da fosfolipase C (PLC)-IP₃-Ca⁺² e P2Y12, P2Y13 e P2Y14 são acoplados à proteína G_i e a sua ativação acarreta na inibição da adenilato ciclase. O P2Y11 também é associado à estimulação da adenilato ciclase (Abbracchio e Burnstock, 1994; Roger et al., 2015).

1.3.3.4. Receptores P2X

Até o momento, já foram identificados sete subtipos de receptores P2X: P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7 (Di Virgilio et al., 2001). Os receptores P2X são exclusivamente ativados por ATP extracelular e desencadeiam seus efeitos via abertura de um canal iônico na membrana celular, permeáveis a Na^+ , K^+ e Ca^{+2} , não parecendo haver o envolvimento nem de proteínas G, tampouco de segundos-mensageiros intracelulares (Abbracchio e Burnstock, 1994; Roger et al., 2015).

Esses receptores são estruturalmente formados por dois segmentos transmembrana que são separados por um grande *loop* extracelular, que serve para a ligação do ATP. Os receptores P2X podem ser homotriméricos, constituídos por subunidades codificadas por um mesmo gene, ou heterotriméricos, onde as subunidades são codificadas por genes de diferentes P2X, originando assim novas disposições: P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/6, P2X4/6 e P2X4/7 (Abbracchio et al., 2009; Roger et al., 2015).

Entre os receptores P2X, o subtipo P2X7 é funcionalmente distinto dos outros e um dos que mais desperta interesse, especialmente na inflamação e no câncer.

1.3.3.4.1. Receptor Purinérgico P2X7

A estrutura genômica do receptor P2X7 consiste em 13 exons, sendo que os exons 12 e 13 codificam o domínio C-terminal dessa molécula. O receptor P2X7 é composto por 595 aminoácidos, os quais formam uma proteína que apresenta dois domínios transmembrana e domínios N e C- terminais intracelulares (Roger et al., 2015).

A ativação do P2X7 através dos seus agonistas (ATP, agonista natural ou BzATP, agonista sintético) abre, em milésimos de segundos, um canal que é seletivamente permeável a cátions, tais como Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (Surprenant et al., 1996;

Rassendren et al., 1997; Roger et al., 2015). A abertura desse canal faz com que ocorra, principalmente, o influxo de cálcio e o efluxo de potássio. A elevação do íon cálcio no espaço intracelular ativa uma série de vias de sinalização, tais como PI3K/Akt, ERK1/2, NF- κ B e NFAT, todas relacionadas com sobrevivência celular (North, 2002; Adinolfi et al., 2005a; Adinolfi et al., 2005b; Di Virgilio et al., 2009; Roger et al., 2015). Além disso, a ativação do P2X7 faz com que ocorra a ativação do inflamassoma NLRP3, que é um complexo multiproteico que dirige a ativação da caspase-1 e, conseqüentemente, o processamento e secreção de IL-1 β e IL-18, importantes ativadores da resposta imune (Stagg e Smyth, 2010). A IL-1 β está ainda envolvida tanto em processos de proliferação como em morte celular, dependendo da sua concentração e da presença de outras citocinas no espaço extracelular (Terlizzi et al., 2014; Roger et al., 2015).

O receptor P2X7 é também conhecido pela sua capacidade de induzir um fenômeno de permeabilização da membrana plasmática que se refere à formação de um poro, permitindo a passagem de moléculas de tamanho de até 900 Da pela membrana. O domínio C-terminal (“cauda do receptor”) é fundamental para a formação desse poro (Roger et al., 2015). Diferente da abertura do canal, a formação do poro ocorre após a exposição ao agonista por tempo prolongado ou em uma alta concentração ($> 100 \mu\text{M}$), e esse fenômeno está principalmente relacionado à morte celular (Roger et al., 2015).

O gene do receptor P2X7 é altamente polimórfico e dois polimorfismos de nucleotídeos simples (SNP) estão sendo muito estudados nesse receptor, 1513A $>$ C (rs3751143) e 489C $>$ T (rs208294), os quais levam à substituição do glutamato por alanina na posição 496 (E496A) e histidina por tirosina na posição 155 (H155Y), respectivamente. A presença de homozigose (1513C/C), localizada na região C-terminal na cauda do receptor, é associada com perda de função do P2X7, não abrindo o canal ou formando o poro na membrana (Gu et al., 2001; Sanz et al., 2014). Esse

polimorfismo foi primeiramente verificado em casos familiares de leucemia linfocítica crônica de células B, onde as células cancerígenas não morriam por apoptose devido à falta de formação do poro na membrana (Dao-Ung et al., 2004). O polimorfismo SNP 489C>T, diferentemente do SNP 1513A>C, acarreta em um aumento de função do receptor purinérgico P2X7, entretanto, até o momento sua presença ou ausência não tem sido relacionada com nenhum tipo de câncer (Gu et al., 2001; Sanz et al., 2014).

O P2X7 já foi demonstrado estar expresso em diversas células como em neutrófilos, linfócitos T e B, eosinófilos, células dendríticas, células *natural killers*, astrócitos, neurônios, monócitos, microglia e macrófagos sendo que é um receptor muito importante para o desencadeamento das respostas fisiológicas do organismo (Idzko et al., 2014, Di Virgilio e Vuerich, 2015; Roger et al., 2015).

Os efeitos mediados por esse receptor são muito variáveis e, dependem do tipo celular, da forma de ativação e da concentração do agonista, podendo desencadear efeitos antagônicos de morte ou de proliferação celular (Di Virgilio et al., 2009). O P2X7 é um dos receptores purinérgicos mais estudado em uma série de patologias, principalmente no câncer (Burnstock, 2008).

1.3.3.4.1.1. Papel do P2X7 em Câncer

Na figura 4 estão representadas as diferentes ativações do P2X7 (Roger et al., 2015):

- por baixas concentrações de ATP (ATP endógeno), na qual ocorre a abertura do canal iônico e desencadeia respostas que acarretam em crescimento tumoral e metástase;

- por altas concentrações de ATP (ATP exógeno) ou por BzATP, na qual ocorre abertura do poro na membrana plasmática e desencadeia respostas que acarretam na morte das células tumorais.

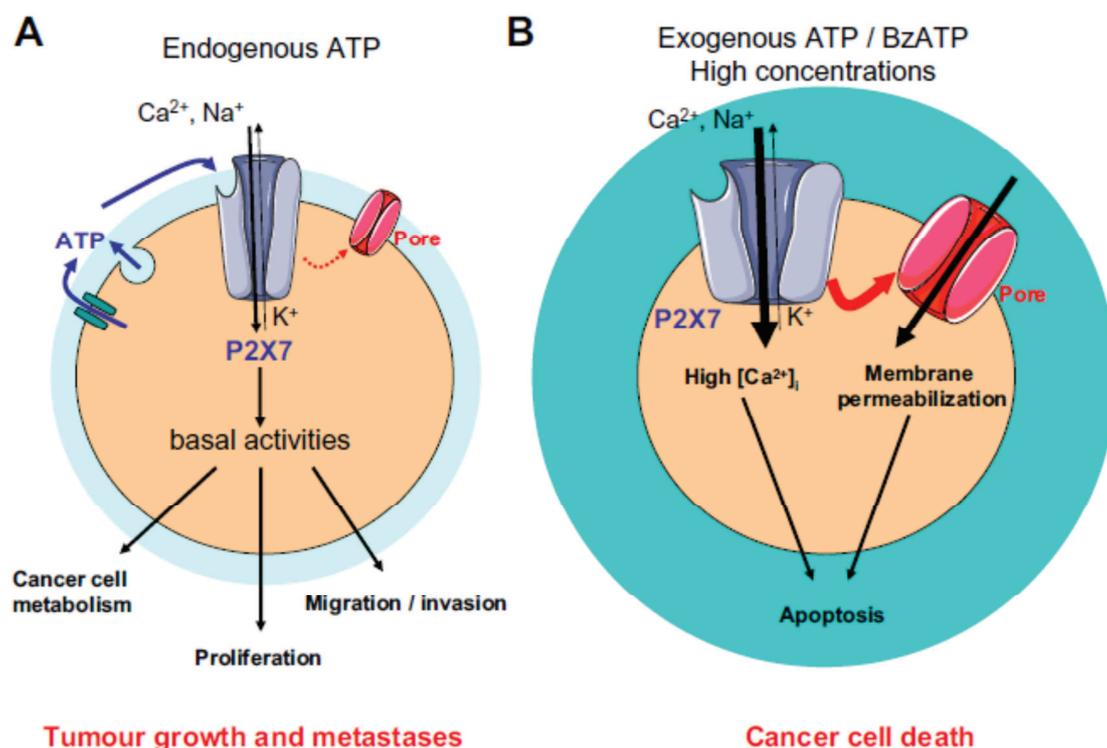


Figura 4: Representação Esquemática do Papel do Receptor Purinérgico P2X7 na Biologia Celular do Câncer (Roger et al., 2015).

Em estudos realizados em células de câncer e em biopsias de diferentes tumores, esse receptor geralmente estava expresso, como por exemplo, em melanoma, câncer de mama, câncer de tireóide, câncer de pâncreas, câncer ovariano, câncer uterino e em diversos tipos de câncer de cérebro (Slater et al., 2003; Slater et al., 2004; White et al., 2005; Kunzli et al., 2007; Solini et al., 2008; Roger et al., 2015).

Em células de melanoma B16, o P2X7 foi responsável pela liberação de ATP em condições ácidas, mimetizando o que ocorre no centro de um tumor e a inibição farmacológica desse receptor diminuiu o crescimento tumoral (Hattori et al., 2012). O

mesmo foi verificado em células de neuroblastoma, onde a antagonização desse receptor levou a diminuição da viabilidade e número celular (Wu et al., 2009; Gómez-Villafuertes et al., 2009). Em células de carcinoma ovariano, a ativação do P2X7 pelo BzATP, levou a ativação de vias como da Akt e ERK e a antagonização do P2X7 desencadeou a diminuição da viabilidade celular (Vázquez-Cuevas et al., 2014). Diversos estudos têm demonstrado que o P2X7 está envolvido com transformação oncogênica, proliferação celular e crescimento tumoral através da sua atividade basal, ou seja, teria uma atividade pró-tumoral independente da ativação exógena desse receptor. Além disso, eles demonstraram que tumores que expressam o P2X7, secretam uma maior quantidade de VEGF, um importante fator angiogênico, muito envolvido com progressão tumoral (Adinolfi et al., 2005a; Adinolfi et al., 2005b; Adinolfi et al., 2009; Di Virgilio et al., 2009; Adinolfi et al., 2012). Em células de glioma C6, a estimulação do P2X7 com BzATP aumentou a migração celular e a liberação de fatores envolvidos com tumorigênese e crescimento tumoral como as citocinas MCP-1/CCL2 e IL-8/CXCL8 e de VEGF (Wei et al., 2008). Em neoplasias como na leucemia linfocítica crônica e no câncer papilar da tireóide, o receptor P2X7 é utilizado como indicador de agressividade da doença, sendo que quanto maior a expressão desse receptor, maior a malignidade (Adinolfi et al., 2002; Kunzli et al., 2007; Roger et al., 2015).

Em contrapartida ao exposto acima, diversos estudos têm demonstrado que o P2X7 estaria envolvido com atividades anticancerígenas. Em células de câncer de mama, o P2X7 regulou negativamente a proliferação celular e o crescimento tumoral por induzir morte por apoptose (Huang et al., 2013). Em células de melanoma B16 e em células de adenocarcinoma de cólon, a ativação do P2X7 através de altas concentrações de ATP induziu morte celular (Bian et al., 2013). Em outro estudo com linhagem de glioma de rato C6 a inibição farmacológica do P2X7 ou o silenciamento desse receptor

aumentou o crescimento celular tanto *in vitro* como *in vivo* (Fang et al., 2013). Além disso, altas concentrações de ATP ou de BzATP diminuíram a proliferação de células da linhagem GL261 de glioma de camundongo (Tamajusuku et al., 2010). O P2X7 também foi relacionado com o aumento da radiosensibilidade em células de glioma humano (M059J) e de camundongo (GL261) (Gehring et al., 2012; Gehring et al., 2015).

Em conclusão, o receptor P2X7 parece ter um papel tanto na morte como na sobrevivência celular e esses efeitos completamente antagônicos e aparentemente tão contraditórios dependem muito da concentração do ATP no meio extracelular, bem como as vias que são ativadas por esse receptor (Adinolfi et al., 2005b). Portanto, é de extrema importância que mais estudos sejam realizados, utilizando diferentes mecanismos de ativação, para o completo entendimento do papel desse importante receptor purinérgico em gliomas e em células imunes associadas aos tumores.

1.4. Novos Alvos Terapêuticos

1.4.1. Ciclooxigenase 2

A via do ácido araquidônico é responsável pela geração de uma variedade de moléculas bioativas. Esses metabólitos, conhecidos como eicosanóides, estão envolvidos em uma variedade de diferentes patologias, incluindo inflamação e câncer (Greene et al., 2011). O ácido araquidônico pode ser metabolizado em eicosanóides através da ação de 3 diferentes grupos de enzimas: ciclooxigenases (COX), lipoxigenases e oxigenases. As enzimas COX catalisam o primeiro passo da síntese de eicosanóides, a prostaglandina H₂ (PGH₂), que é a precursora para a síntese de diversos prostanóides, como a prostaglandina E₂ e tromboxanos (Cebola e Peinado, 2012).

A COX possui duas importantes isoformas: COX-1 (também conhecida como

PTGS1) e a COX-2 (PTGS2). O perfil de expressão dessas duas isoformas é muito variado de tecido para tecido. A COX-1 é uma enzima constitutiva, sendo responsável pela produção de prostanóides e altamente expressa em diversos tecidos, incluindo pulmão, próstata, cérebro, trato gastrointestinal, fígado, rim e baço. Em oposição, a COX-2 é frequentemente uma enzima induzível e geralmente indetectável na maioria dos tecidos normais. É responsável pela maior produção de prostanóides durante períodos inflamatórios (Cebola e Peinado, 2012).

A COX-2 tem papel importante por regular a proliferação e diferenciação celular e tumorigênese (DuBois et al., 1996; Bornfeldt et al., 1997). Essa enzima está superexpressa em diversos tecidos neoplásicos, como em câncer de cólon, próstata, esofágico, de mama e em gliomas (Bertagnolli, 1999; Zimmermann et al., 1999; Casper et al., 2000; Higashi et al., 2000; Howe et al., 2001). Em biópsias de gliomas, a expressão da COX-2 foi maior em tumores de alto grau (III e IV) quando comparada a tumores de baixo grau (grau I e II), portanto, essa enzima está associada com maior malignidade e com um pior prognóstico para os pacientes (Shono et al., 2001; New, 2004).

A utilização de medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides (NSAID) e inibidores específicos de COX-2 têm emergido como um possível tratamento e prevenção de diversos tipos de câncer (cólon, próstata, esofágico e de mama) (Pouliot et al.; 2002; New 2004). Além disso, recentemente foi descrito que a utilização de NSAID como acetaminofeno, flurbiprofeno, ácido acetilsalicílico e ibuprofeno e NS-398 (inibidor seletivo de COX-2) reduziram a proliferação celular em linhagens de glioma (Casper et al., 2000; New 2004; Bernardi et al. 2006), entretanto os mecanismos exatos para a diminuição celular não estão completamente elucidados.

Alguns estudos têm demonstrado a relação entre sistema purinérgico e a enzima COX-2. Em células de carcinoma alveolar, o ATP e o UTP extracelulares levaram ao aumento da expressão da enzima COX-2 por ativar receptores do tipo P2 (Marcet et al., 2007). Além disso, Barberà-Cremades e colaboradores demonstraram que a ativação do P2X7 gerou uma maior produção de prostaglandina E2 em macrófagos (Barberà-Cremades et al., 2012). Com o exposto acima, é de extrema relevância verificar se há relação entre o sistema purinérgico e a enzima COX-2 em gliomas.

1.4.2. Ácido Ursólico

Para o desenvolvimento de novos fármacos, a especialidade oncológica desperta o interesse de muitos pesquisadores, devido à falta de medicamentos eficazes e, nesse cenário, as plantas continuam a ser uma ótima forma para a obtenção de novas moléculas terapêuticas (Shanmugam et al., 2013).

Uma importante classe de fitoquímicos bioativos são os triterpenóides, eles representam uma grande família, sendo que já foram identificados mais de 20.000 tipos. Entre os vários terpenóides, os triterpenóides pentacíclicos têm demonstrado ações anti-inflamatórias, quimiopreventivas e anticâncer (Shanmugam et al., 2013). Um importante exemplo é o ácido ursólico (3β -hidroxi-urs-12-en-28-oic-ácido) que pode ser encontrado em maçãs, peras, ameixas, *cranberry* e *bearberry* (Shanmugam et al., 2013). Por muito tempo essa molécula foi considerada biologicamente inativa, entretanto, recentemente ela tem demonstrado efeitos farmacológicos juntamente com baixa toxicidade (Ikeda et al., 2008). Já foram descritas propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas, pró-apoptóticas, antimetastásica e antiangiogênicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Ikeda et al., 2008; Shanmugam et al., 2013).

Diferentes vias de sinalização podem ser ativadas ou inibidas pelo ácido ursólico

e, portanto, desencadear diferentes tipos de morte celular, como por exemplo, em linhagens celulares de próstata, essa molécula ocasionou a *downregulation* de diversos genes regulados pelo NF-kB e STAT3, que estão envolvidos com proliferação, sobrevivência e angiogênese e induzindo a morte por apoptose (Shanmugan et al., 2011). Ainda em linhagem de câncer de próstata, o ácido ursólico induziu autofagia (Zhang et al., 2010; Shin et al., 2012). Em células de câncer de col retal, essa molécula levou a *downregulation* de fatores antiapoptóticos como Bcl-2 e survivina, proliferativos como ciclina D1 e metastáticos como MMP-9, VEGF, ICAM-1 (Prasad et al., 2012). Além disso, em células de câncer de pâncreas, o ácido ursólico foi capaz de induzir morte por apoptose através da modulação das vias JNK e PI3K/Akt e NF-kB (Li et al., 2012). Em linhagem celular de leucemia, o ácido ursólico, através da superexpressão da PTEN, inibiu a atividade da Akt, e aumentou a atividade das caspases, levando morte por apoptose (Wu et al., 2012). Em células de câncer hepático, esse triterpenóide foi capaz de reduzir diferentes fatores angiogênicos como VEGF, IL-8/CXCL8 e óxido nítrico, portanto, reduzindo a progressão tumoral (Lin et al., 2011). Em gliomas, na linhagem humana U251, o ácido ursólico foi capaz de inibir a proliferação e induzir apoptose através da supressão da via TGF- β 1/miR-21/PDCD4 (Wang et al., 2012). Em contrapartida, em outra linhagem de glioma humano (U87MG), essa molécula induziu morte por autofagia desencadeada pelo stress ocasionado no retículo endoplasmático dependente de ROS (Shen et al., 2014). Na linhagem humana DBTRG-05MG, o ácido ursólico alterou as funções mitocondriais, acarretando na diminuição do ATP e induzindo morte por necrose (Lu et al., 2014). Em linhagem de glioma de rato C6, o ácido ursólico ocasionou a *downregulation* da MMP-9 e com isso a diminuição da invasão celular (Huang et al., 2009). Modelos *in vivo* de carcinoma de próstata (Shanmugan et al., 2011), carcinoma hepatocelular (Shao et al., 2011), carcinoma

colorectal (Prasad et al., 2012), carcinoma de mama (De Angel et al., 2010), carcinoma de pele (Kowalczyk et al., 2009), câncer gástrico (Wang et al., 2011) e leucemia (Gao et al., 2012) têm demonstrado que o ácido ursólico inibe o crescimento e a progressão tumoral.

Com o acima exposto, uma vez que nenhum estudo foi realizado em modelo *in vivo* de glioma, consideramos de extrema importância verificar o efeito do ácido ursólico nesse tipo tumoral e verificar sua eficácia terapêutica.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a participação do sistema purinérgico e sistema imune no desenvolvimento e progressão do glioblastoma multiforme, bem como investigar a participação da enzima COX-2 nesse contexto e, além disso, avaliar alternativas terapêuticas para esse tipo tumoral.

2.2. Objetivos Específicos

* Discutir, através de revisão bibliográfica, o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares pelas enzimas do sistema purinérgico (ectonucleotidasas) em células tumorais, com foco principal em glioma, e em células do sistema imune (Capítulo I);

* Avaliar a modulação do fenótipo de macrófagos expostos ao meio condicionado de glioma e verificar a participação dos receptores purinérgicos nessa modulação (Capítulo II);

* Caracterizar a expressão e funcionalidade do receptor purinérgico P2X7 em linhagem de glioma humano e avaliar a participação desse receptor na progressão tumoral *in vitro* e *in vivo* (Capítulo III);

* Avaliar se há relação entre o receptor purinérgico P2X7 e a enzima COX-2 em linhagem de glioma *in vitro* e *in vivo* (Capítulo IV);

* Investigar o efeito do ácido ursólico em linhagens de glioma, estudando os possíveis mecanismos envolvidos *in vitro* e avaliar a atividade antitumoral dessa molécula *in vivo* (Capítulo V).

3. CAPÍTULO

3. CAPÍTULO

3.1. Capítulo I

Ectonucleotidases in Tumor Cells and Tumor-Associated Immune Cells: An Overview

Letícia Scussel Bergamin, Elizandra Braganhol, Rafael Fernandes Zanin, Maria Isabel Albano Edelweiss, and AnaMaria Oliveira Battastini

Periódico: **Journal of Biomedicine and Biotechnology**

Status: **Publicado**