

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Gabriela Nogueira Debom

**O papel multifacetado dos astrócitos
associados ao tumor: Análise da
participação da sinalização
adenosinérgica na progressão do
glioblastoma**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2024**

Gabriela Nogueira Debom

O papel multifacetado dos astrócitos associados ao tumor: Análise da participação da sinalização adenosinérgica na progressão do glioblastoma

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elizandra Braganhol

**Porto Alegre
2024**

Catálogo na Publicação

Debom, Gabriela Nogueira

O papel multifacetado dos astrócitos associados ao tumor: Análise da participação da sinalização adenosinérgica na progressão do glioblastoma / Gabriela Nogueira Debom. -- 2024.

169 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2024.

Orientador(a): Elizandra Braganhol.

1. Astrócitos. 2. Adenosina. 3. Microambiente tumoral.
4. Glioblastoma. I. Título.

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil, no laboratório de Biologia Celular e no laboratório de Imunobiologia do Câncer (LabBraganhó). Parte dos experimentos foram realizados no Instituto de Cardiologia - Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, RS, Brasil. Durante o período de doutoramento sanduíche, o estudo foi realizado na University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, United States of America. Este estudo teve como agentes financiadores o Programa de Bolsas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de bolsa no período regular e de bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

Durante toda a minha trajetória de doutorado, eu tive a oportunidade de estudar as mais complexas facetas do glioblastoma. Mas nem de perto eu imaginava que iria conhecer a pior delas: a de vivenciá-lo na minha família.

Eu dedico esta tese de doutorado para o meu padrasto, Luiz Fernando. Como eu gostaria que as palavras contidas em cada capítulo dessa tese fossem capazes de me dar um superpoder para te ajudar a vencer essa batalha.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer à minha família pelo apoio incondicional que todos eles me deram para que eu tivesse todo o tempo que quisesse dedicado à minha formação profissional. Durante o período de doutoramento, pude me dedicar 100% ao meu trabalho, e sei que isso foi imprescindível para eu conseguir realizar o que planejei, e executar com excelência tanto os experimentos de bancada quanto à escrita desta tese.

Agradeço especialmente ao meu marido, Matheus, por estar ao meu lado mesmo quando isso quis dizer estar a milhares de quilômetros de distância. Assim como escrevi nos agradecimentos ao longo de todos os trabalhos de minha vida, escrevo novamente aqui: esse título também é teu.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Profa. Dra. Elizandra Braganhol, por ter acreditado no meu potencial e por todas as horas investidas na minha formação. É preciso agradecer também meus colegas de laboratório, à equipe do Lab Braganhol. Todos eles se fizeram presentes nas discussões de projetos e dos dados experimentais, e na realização dos experimentos. Ciência se faz em grupo, e eles fazem também parte crucial do desenvolvimento dos manuscritos presentes nessa tese.

Não posso deixar de agradecer também o Prof. Dr. Gary Kohanbash, que aceitou me receber durante o período de doutorado sanduíche. A ele, e aos colegas que fiz em seu laboratório, agradeço a recepção atenciosa e por terem me cedido o espaço para que eu realizasse as minhas atividades. Foi sem dúvida um grande desafio, mas que impulsionou o impacto científico desta tese.

Agradeço enormemente às colegas que fiz no caminho, e que se tornaram grandes amigas e peças-chave para a realização do meu trabalho. Primeiramente, agradeço à Dominique, que divide a autoria do primeiro artigo dessa tese, e também vários aprendizados durante a pandemia da COVID-19. Além de colega de doutorado, foi minha dupla em várias disciplinas, e minha companheira para desbravar outras maneiras de fazer ciência, seja participando de projetos de extensão, indo às ruas fazer testes de covid, ou até palestrando sobre a página divulgação científica que criamos no instagram. Muito obrigada Domi, por me inspirar a ser melhor a cada dia. E agradeço à Juliana, que colocou um teto sobre minha cabeça quando cheguei em Pittsburgh, e um chão sob meus pés quando tive dúvidas sobre o objetivo da minha pesquisa. Os manuscritos dois e três desta tese só existem porque tive nela a ajuda para planejar e executar os experimentos, e para

comemorar quando eles davam certo. Ju e Sai, muito obrigada por serem minha família em Pittsburgh.

Gostaria de agradecer a todos os professores e mestres que ajudaram na realização deste trabalho. Agradeço à minha banca de acompanhamento, Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia Filho e Profa. Dra. Alessandra Peres, pelas colaborações desde quando este trabalho era apenas um projeto. Também à minha banca de qualificação, novamente o Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia Filho, o Prof. Dr. Jose Alexandre Marzagão Barbuto e a Dra. Clarissa Branco Haas, meu muito obrigada pelo tempo investido nas correções e por todas as ideias para melhorar o trabalho.

Por fim, agradeço à UFCSPA e ao Programa de Pós-graduação em Biociências por permitir a realização deste trabalho. E às agências de fomento, em especial à CAPES, que possibilitou que eu me dedicasse exclusivamente ao meu doutorado, e que me contemplou com uma bolsa de doutorado sanduíche.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. O papel das células gliais no Sistema Nervoso Central	16
2. Astrócitos: as células gliais mais abundantes do Sistema Nervoso Central	18
3. Glioblastoma: o tumor cerebral primário de maior incidência na população.....	22
4. O papel do astrócito no microambiente do glioblastoma	25
5. A modulação do sistema adenosinérgico no microambiente do GB	29
OBJETIVOS	33
ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	34
ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	49
ARTIGO CIENTÍFICO 3.....	77
DISCUSSÃO	106
CONCLUSÃO.....	121
PERPECTIVAS.....	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
Anexo I: Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal <i>University of Pittsburgh</i>	135
Anexo II: Design experimental e resultados parciais estudo <i>in vivo</i> da administração de APCP em camundongos	144
Anexo III: Trabalho de Conclusão de Curso aluna Maria Paula de Medeiros	146
Anexo IV: Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre	161
Anexo V: Currículo Lattes.....	164

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

μM - micromolar

A1R - Receptor de adenosina do tipo P1 e subtipo A1

A2AR - Receptor de adenosina do tipo P1 e subtipo A2A

A2BR - Receptor de adenosina do tipo P1 e subtipo A2B

ACSA-2 - *astrocyte cell surface antigen-2*

Actb - Actina beta

ADP - Adenosina difosfato

ALDH1L1 - membro L1 da família da enzima aldeído desidrogenase 1 (*aldehyde dehydrogenase 1 family member L1*)

AMP - Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato

ATRX - *ATP-dependent X-linked helicase*

BHE - Barreira hemato-encefálica

BLI - Intensidade de bioluminescência *in vivo*

C1q - Componente do complemento 1q

C3 - Fator do complemento 3

Camk1d - Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina tipo 1d (*calcium/calmodulin dependent protein kinase ID*)

CCL17 - Quimiocina CC ligante 17 (*chemokine C-C ligand 17*)

CCL22 - Quimiocina CC ligante 22 (*chemokine C-C ligand 22*)

CSF - Fator estimulante de colônia

DAMP - Padrão molecular associado ao dano (*damage-associated molecular pattern*)

EAE - Encefalomielite autoimune experimental

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

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

EVs - vesículas extracelulares

GB - Glioblastoma

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial

GLAST – transportador de glutamato e aspartato (*glutamate aspartate transporter*)

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HIF - *hypoxia-inducible factors*

IDH – Isocitrato desidrogenase

IFN-β - Interferon beta

IFN-γ - Interferon gama

IL-10 - Interleucina 10

IL-13 - Interleucina 13

IL-1α - Interleucina 1α

IL-1β – Interleucina 1β

IL-23 - Interleucina 23

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

L-12 - Interleucina 12

LPS – Lipopolissacarídeo

MGMT - O-6-metilguanina-DNA metiltransferase

MMP14 - Metaloproteinase 14

MMP2 – Metaloproteinase 2

NDRG2 - Proteína NDRG membro 2 (*NDRG family member 2*)

NF-κB - Fator nuclear kappa B

nM - nano molar

NO - Óxido nítrico (*nitric oxide*)

NTPDase 1/CD39 - Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1

NTPDase 2 - Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 2

OMS - Organização Mundial da Saúde

P1Rs - Receptores purinérgicos do tipo P1

P2Rs - Receptores purinérgicos do tipo P2

P2XRs - Receptores purinérgicos do tipo P2 ionotrópicos

P2YRs - Receptores purinérgicos do tipo P2 metabotrópicos

PDGFB - Subunidade B do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor subunit B*)

RI - Radiação Ionizante

ROS - Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

S100a10 - *S100 calcium-binding protein A10*

S100β - subunidade β da proteína S100 (*β-subunit of S100 protein*)

SBGB - *Sleeping Beauty Glioblastoma*

scRNAseq - RNA de célula única (*Single-cell RNA sequencing*)

SLC1A2 - *Solute Carrier Family 1 Member 2*

SNC - Sistema Nervoso Central

SVZ - Zona subventricular (*subventricular zone*)

TAA - astrócitos associados ao tumor (*tumor-associated astrocytes*)

TAM - Macrófagos/micróglia associados ao tumor (*tumor-associated macrophages/microglia*)

TCGA - Atlas do Genoma do Câncer (*The Cancer Genome Atlas*)

TGF- β - Fator de crescimento transformador-beta

TLR4 – Receptor Toll do tipo 4 (*Toll-like receptor 4*)

TME - Microambiente tumoral (*tumor microenvironment*)

TMZ - Temozolomida

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

TP53 - Proteína p53

Treg - Células T-regulatórias

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Ilustração da neuroglia conforme descrita por Rudolf Virchow.....	17
Figura 2	Imagens da astroglia desenhadas por Santiago Ramon y Cajal.....	17
Figura 3	Morfologia dos <i>endfeet</i> de astrócitos.....	19
Figura 4	Participação ativa dos astrócitos da sinapse tripartita.....	20
Figura 5	Os astrócitos reativos apresentam aumento da proteína GFAP e hipertrofia.....	21
Figura 6	Possível delineamento do perfil dos astrócitos reativos.....	22
Figura 7	Histograma da classificação e estadiamento de gliomas de acordo com a atualização da WHO realizada no ano de 2021.....	23
Figura 8	O microambiente tumoral do GB.....	25
Figura 9	Representação esquemática dos componentes do TME nos gliomas/glioblastoma.....	27
Figura 10	Representação gráfica da cascata purinérgica.....	30

RESUMO

O glioblastoma (GB) é o tumor cerebral primário de maior incidência entre os adultos, apresentando um prognóstico devastador com uma média de sobrevida de apenas 12 – 15 meses. O microambiente tumoral (TME) desempenha um papel crucial na agressividade do GB, principalmente no estabelecimento de imunossupressão e evasão imune. Os astrócitos reativos presentes no TME podem favorecer a proliferação e invasão das células tumorais, contribuindo para o estabelecimento e avanço do tumor. Além disso, a adenosina, produzida pela enzima CD73 e expressa tanto por células tumorais como pelas demais células do TME, tem um papel crucial na imunomodulação do TME, sendo a inibição da CD73 eficaz na redução do crescimento e da agressividade do tumor. Considerando isso, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar os efeitos da sinalização adenosinérgica no microambiente estabelecido pelo GB, principalmente relacionado à influência dos astrócitos associados ao tumor. O capítulo 1 da presente tese traz uma revisão na literatura científica sobre o tema, onde investigou-se o papel dos diversos marcadores purinérgicos (enzimas e receptores) nos diferentes fenótipos de astrócitos reativos, sugerindo a via adenosinérgica como um novo alvo para a otimização da eficiência terapêutica do tratamento para o GB. Subsequente a isso, no capítulo 2 foi avaliado o efeito da adenosina na resistência *in vitro* ao tratamento com exposição à radiação ionizante (RI), um dos pilares da terapia utilizada em pacientes com GB. Para tal, foram utilizadas 3 diferentes linhagens celulares de GB. Nossos resultados sugerem que as células expostas à radiação apresentaram níveis mais elevados de expressão de CD73 e atividade enzimática. Além disso, fomos capazes de observar um efeito relevante na taxa de crescimento das células de GB após a exposição à RI combinada com um inibidor farmacológico de CD73. Esses resultados evidenciaram um efeito promissor na inibição da produção de adenosina no TME para aumentar a eficácia da radioterapia. Por fim, no capítulo 3 da presente tese foi investigado o papel do TME do GB sobre a reatividade astrocitária e as consequências dessa modulação sobre a progressão tumoral. Foram utilizadas amostras primárias provenientes de um modelo animal de indução de GB para a análise por meio da ferramenta de *Single cell RNA-seq*. Os resultados mostraram que os astrócitos provenientes de amostras do tumor, ou seja, os chamados astrócitos associados ao tumor (TAA), possuem um perfil transcricional único, relacionado a importantes marcadores associados à ativação de vias inflamatórias, como a resposta celular frente ao lipopolissacarídeo e o recrutamento de células imunes. Além

disso, é demonstrado também que a interação entre células tumorais e astrócitos contribui diretamente para a reatividade dos astrócitos associados ao tumor, influenciando a imunomodulação do TME. Em suma, os dados obtidos nos três capítulos desta tese indicam que a via adenosinérgica apresenta-se com um potencial para ser um novo alvo na otimização da eficiência terapêutica do tratamento usualmente escolhido como padrão ouro para o GB, além de lançar uma visão promissora sobre o papel dos astrócitos reativos na fisiopatologia do GB.

ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is the most common primary brain tumor among adults, presenting a devastating prognosis with an average survival of only 12 - 15 months. The tumor microenvironment (TME) plays a crucial role in the aggressiveness of GB, particularly establishing immunosuppression and immune evasion. Reactive astrocytes present in the TME can promote the proliferation and invasion of tumor cells, contributing to the tumor establishment and progression. Adenosine, produced by the enzymatic activity of CD73, plays a crucial role in TME immunomodulation, and CD73 inhibition has been shown to be effective in reducing tumor growth and aggressiveness. Considering that, the present study aimed to evaluate the effects of adenosinergic signaling (mediated by adenosine) on the TME established by GB, particularly related to the influence of tumor-associated astrocytes on tumor progression. Chapter 1 provides a literature review investigating the role of purinergic markers (enzymes and receptors) in different phenotypes of reactive astrocytes, suggesting the adenosine pathway as a new target for optimizing therapeutic efficacy in GB treatment. Subsequently, in Chapter 2, the effect of adenosine on *in vitro* resistance to treatment with ionizing radiation (IR), one of the pillars in therapy for GB patients, was assessed using three different GB cell lines. Our results indicate that cells exposed to radiation showed higher levels of CD73 expression and enzymatic activity. Additionally, a significant effect on GB cell growth rate was observed after exposure to IR combined with a pharmacological CD73 inhibitor. These findings highlight a promising effect of inhibiting adenosine production in the TME for potential therapeutic advancement of radiotherapy. Finally, in chapter 3 of this thesis, the role of the GB TME in astrocyte reactivity and the consequences of this modulation on tumor progression were investigated. Primary samples from an animal model of GB were used for analysis using *Single cell RNA-seq* tool. The results showed that astrocytes from tumor samples, known as tumor-associated astrocytes (TAA), have a unique transcriptional profile, related to important markers associated with the activation of inflammatory pathways, such as cellular response to lipopolysaccharide and immune cell recruitment. Furthermore, it is also demonstrated that the interaction between tumor cells and astrocytes directly contributes to the reactivity of tumor-associated astrocytes, influencing TME immunomodulation. In summary, the data obtained in the three chapters of this thesis indicate that the adenosine pathway holds potential to be a new target in

optimizing the therapeutic efficiency of the treatment commonly chosen as the gold standard for GB, and provide a promising view on the role of reactive astrocytes in GB pathophysiology.

INTRODUÇÃO

1. O papel das células gliais no Sistema Nervoso Central

O Sistema Nervoso Central (SNC) é composto de dois grandes tipos celulares: os neurônios e as células da glia. Historicamente considerados as principais células do SNC, os neurônios tiveram a sua morfologia e função detalhadamente descritas pelos mais diversos autores ao longo dos mais de 100 anos desde a sua primeira descrição (1,2). De fato, os neurônios são elementos fundamentais para o funcionamento do SNC, sendo responsáveis pelo processamento e compartilhamento das informações por meio de sinapses elétricas (1). Entretanto, o antigo panorama simplista que traz as células neuronais como componente majoritário no SNC tem mudado, e atualmente os neurocientistas vêm colocando o seu foco de estudo também nas demais células presentes no sistema: as células da glia.

O termo “glia” é derivado da palavra em grego para “cola”, e a explicação por trás da escolha do nome está em como estas células eram descritas pelos neuroanatomistas do século XIX: como formadoras de uma estrutura conectiva com capacidade de dar suporte aos neurônios (1,2). A estrutura da glia foi descrita pela primeira vez no ano de 1856, em um seminário ministrado pelo médico patologista Rudolf Virchow, onde foi apresentado o conceito ao qual ele chamou de “*nervenkitt*”, ou “*neuroglia*” – a cola que ligava as células nervosas (3) (Figura 1).

Alguns anos mais tarde, por volta de 1900, Santiago Ramón y Cajal ampliou o conhecimento acerca das células gliais, demonstrando evidências histológicas de que neurônios e células gliais seriam estruturas celulares individuais (4). Utilizando um aprimoramento de uma técnica de coloração proposta primeiramente por Camilo Golgi, Ramón y Cajal foi capaz de visualizar neurônios e células gliais por meio de marcação em marrom/preto em um fundo contrastante amarelo, que permite diferenciar as duas células em suas estruturas individualizadas (4) (Figura 2). Desde então, a otimização das técnicas de microscopia vem permitindo entender mais profundamente a morfologia dessas células. Juntamente a isso, o desenvolvimento de metodologias para análise molecular contribui com o delineamento do papel das células gliais no SNC.

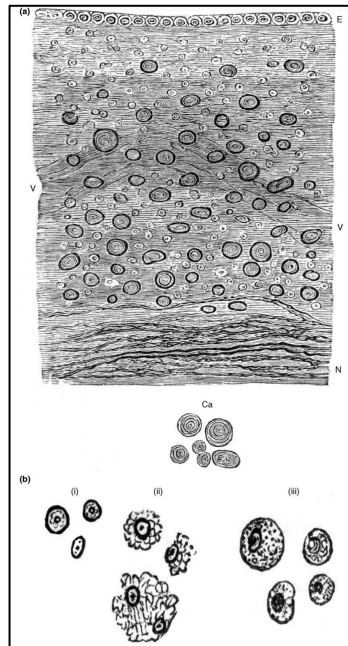


Figura 1: Ilustração da neuroglia conforme descrita por Rudolf Virchow. (a) Para Virchow, a neuroglia consistiria em uma porção independente de tecido conjuntivo repleto de “fibras gliais” que permearia alguns “componentes celulares, destacados em (b). (i) Núcleos livres com nucléolo, (ii) núcleos com corpos celulares parcialmente rompidos, e (iii) células íntegras. Ainda na figura, (ca) são corpúsculos amiloides. Fonte: Imagem retirada de (1)

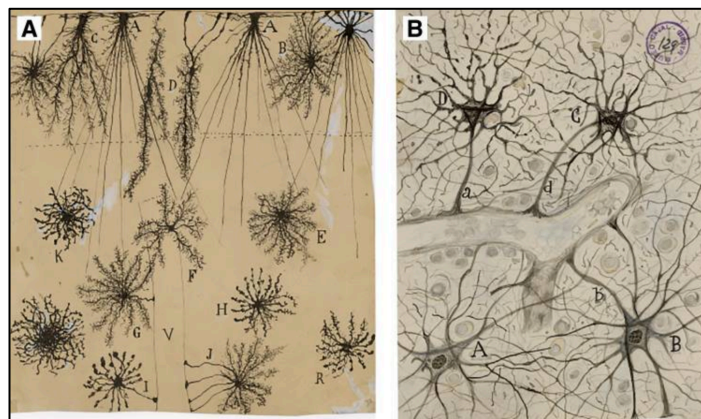


Figura 2: Imagens da astroglia desenhadas por Santiago Ramon y Cajal. Em (A) é possível visualizar uma imagem feita a partir da técnica de Golgi, e em (B) desenhos de astrócitos perivasculares. Fonte: Imagens retiradas de (5)

Atualmente, sabe-se que as células gliais são as mais abundantes do SNC, constituindo aproximadamente metade das células presentes nesse sistema (2). Esse número expressivo dá indícios da sua importância: elas são responsáveis não só pela nutrição, proteção e sustentação dos neurônios, mas também guiam a migração de células neurais e seus precursores durante o desenvolvimento, além de atuar diretamente nas

sinapses neuronais respondendo e modulando os processos de neurotransmissão e de gliotransmissão (6,7).

As células gliais são classificadas em 3 principais tipos celulares: astrócitos, oligodendrócitos e microglia (1,6). Astrócitos e oligodendrócitos têm a sua origem a partir de células neurais progenitoras, e a microglia, por sua vez, são derivadas de células do saco embrionário, sendo conhecidas como os macrófagos residentes do SNC (8). De forma simplificada, a microglia é uma classe de células imunes responsáveis por realizar fagocitose e eliminar *debris* no ambiente neuronal (8). Já os oligodendrócitos são responsáveis, dentre outras funções secundárias, pelo processo de mielinização (1). E, por fim, os astrócitos são as células gliais mais numerosas no encéfalo, sendo classificadas como elementos-chave para a homeostase cerebral (1).

2. Astrócitos: as células gliais mais abundantes do Sistema Nervoso Central

O termo astrócito foi proposto primeiramente por Michael von Lenhossék no ano de 1895, porém a popularização do termo só ocorreu anos mais tarde, através dos desenhos realizados por Santiago Ramón y Cajal, que demonstravam o “formato de estrela” desse tipo celular (5) (Figura 2). O astrócito apresenta uma grande importância não só para a homeostase do SNC, mas também para o próprio entendimento das funções dos diversos componentes celulares presentes nele. Isso porque o aprofundamento do conhecimento acerca do astrócito serviu de ponto inicial para o entendimento da relação entre as células gliais e neurônios (FREEMAN, 2010; MOLOFSKY; DENEEN, 2015; SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Os astrócitos são células muito abundantes no SNC de mamíferos (10). Essa presença em grande quantidade dá pistas sobre a sua relevância: atualmente, através de dados gerados por técnicas modernas de microscopia, é possível descrever as várias funções desempenhadas por eles do SNC. Astrócitos possuem uma morfologia complexa, apresentando de 5 a 12 ramificações principais a partir do seu corpo celular, que por sua vez continuam a ramificar-se formando uma rede (12). Por meio das porções terminais de suas ramificações – os chamados pés terminais, ou *endfeets* –, eles participam da formação e manutenção da barreira hemato-encefálica (BHE), uma membrana protetora entre o SNC e o restante do corpo responsável pela regulação do transporte de substância

por meio da sua permeabilidade seletiva, protegendo o tecido nervoso contra a entrada de moléculas tóxicas e patógenos (12).

Os pés terminais de astrócitos realizam também outras funções vitais para o funcionamento do SNC. Mesmo com as suas diferenças morfológicas relacionadas ao local em que se encontram no encéfalo, virtualmente todos os astrócitos da porção cinzenta estão em contato direto com pelo menos 1 a até 6 vasos sanguíneos, o que quer dizer que a vasculatura do SNC está praticamente toda envolta em terminações astrocíticas (12). Dessa forma, os astrócitos são responsáveis também pela regulação do fluxo sanguíneo, a absorção de nutrientes e a eliminação de resíduos no SNC (12) (Figura 3).

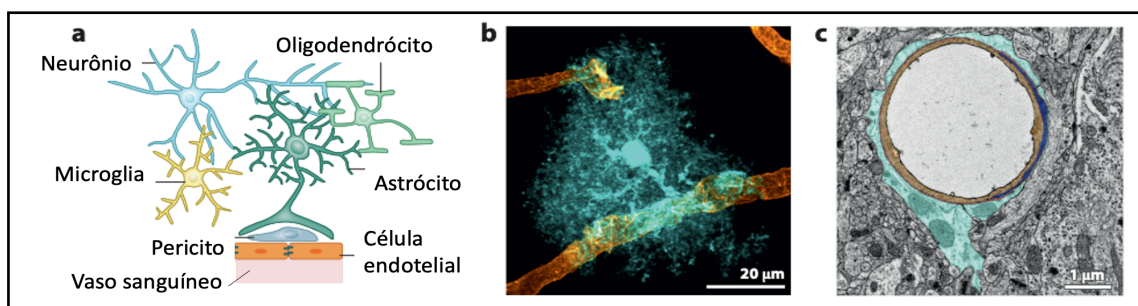


Figura 3: Morfologia dos pés terminais de astrócitos. (a) Esquema representando as interações conhecidas dos astrócitos com outros tipos de células do SNC. (b) Imagem de microscopia confocal de um astrócito (azul-petróleo) interagindo com capilares cerebrais (laranja). Os “pés” dos astrócitos podem ser vistos envolvendo os vasos sanguíneos. (c) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de um corte transversal de um capilar cerebral. Células endoteliais cerebrais (laranja) formam a parede do vaso. Os *endfeet* dos astrócitos (azul-petróleo) envolvem o vaso. Fonte: Figura adaptada de (12).

Além disso, é também relatado na literatura a participação dos astrócitos como reguladores fundamentais da sinaptogênese (13,14). Diversos autores descrevem que astrócitos são capazes de estabelecer uma comunicação bidirecional com os neurônios, sendo essa participação ativa e direta na sinapse neuronal denominada Sinapse Tripartite - referindo-se aos 3 componentes: neurônio pré-sináptico, neurônio pós-sináptico e, por fim, o astrócito (13). Astrócitos respondem à neurotransmissores liberados pelos neurônios na fenda sináptica, desencadeando elevações de cálcio intracelular que, subsequentemente, levam à liberação de gliotransmissores, dentre eles a D-serina, o glutamato e a adenosina trifosfato (ATP) (15) (Figura 4).

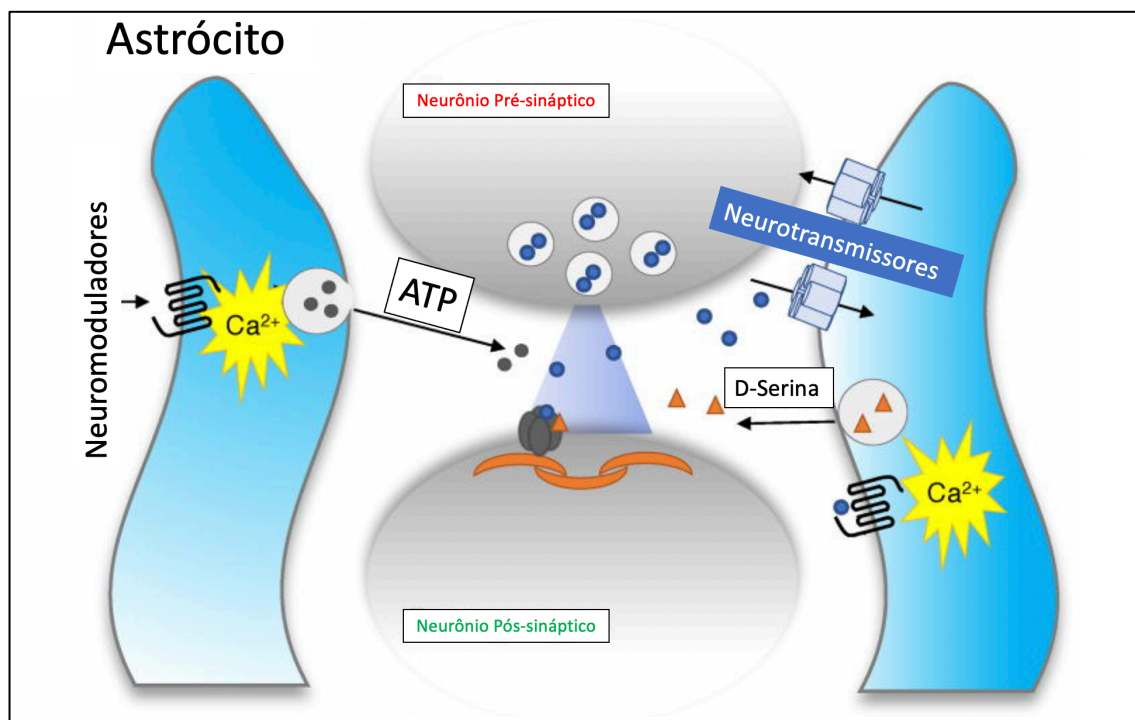


Figura 4: Participação ativa dos astrócitos da sinapse tripartite. Os astrócitos possuem a capacidade de detectar a atividade sináptica e responder a ela através de ondas intracelulares de Ca^{2+} , levando à liberação de gliotransmissores que podem sinalizar de volta às sinapses. Fonte: figura adaptada de (14).

Ademais, os astrócitos também são universalmente reconhecidos como um dos principais participantes da resposta tecidual do SNC frente a condições patológicas (16). Ao sofrer injúria, já é bem estabelecido na literatura que o astrócito pode sofrer modificações, deixando o seu estado quiescente, e tornar-se ativo, em um processo denominado reatividade astrocítica (17). Durante esse processo, eles podem sofrer hipertrofia e ativação da proliferação celular, com o intuito de migrar até o sítio da injúria e formam uma "cicatriz glial" (16,18). Além disso, há uma *up-regulation* de expressão de filamentos intermediários como nestina, vimentina e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (18). A proteína GFAP é também utilizada como um marcador astrocitário clássico, sendo extremamente valioso para a identificação e avaliação da morfologia de astrócitos em ensaios imuno-histoquímicos (5,19) (Figura 5). Além do GFAP, astrócitos apresentam alguns outros marcadores moleculares muito utilizados para a sua identificação, como a subunidade β da proteína S100 (S100 β), o membro L1 da família da enzima aldeído desidrogenase 1 (ALDH1L1) e o transportador de glutamato e aspartato (GLAST) (20).

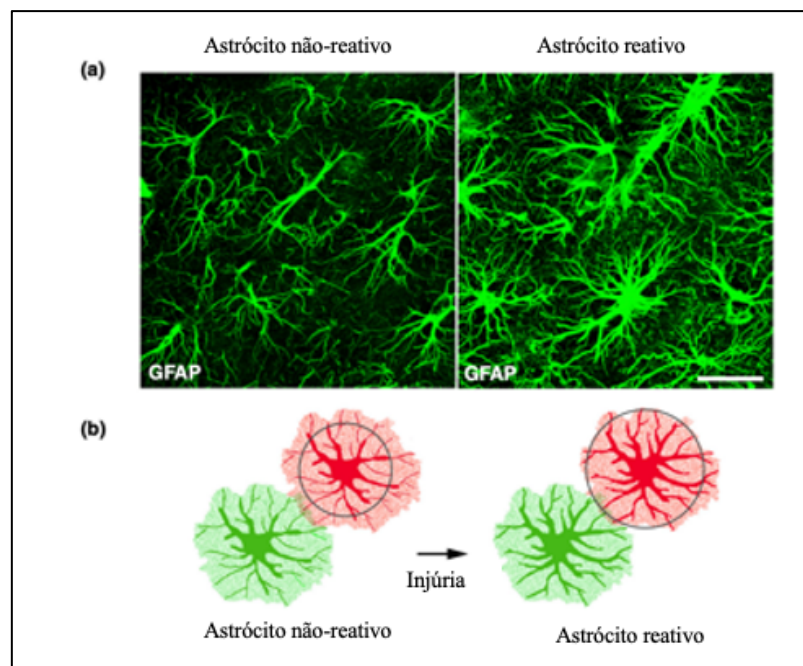


Figura 5: Os astrócitos reativos apresentam aumento da expressão da proteína GFAP e hipertrofia. (a) Os filamentos intermediários foram marcados utilizando anticorpos contra GFAP (e podem ser visualizados na cor verde) e revelam hipertrofia dos processos celulares dos astrócitos reativos (direita) em comparação com aqueles no tecido não lesionado (esquerda). (b) Representação esquemática da reação dos astrócitos à injúria. No círculo é possível notar que os astrócitos reativos tornam-se mais espessos e mais longos. Apesar de os processos principais dos astrócitos reativos se tornarem mais espessos. Fonte: imagem adaptada de (19).

O processo de reatividade astrocítica é complexo e heterogêneo (17,21). Recentemente, têm-se sugerido que os astrócitos possam assumir fenótipos diferenciados - denominados A1 e A2 - seguindo um espectro de ativação (22,23) (Figura 6). Enquanto os astrócitos do tipo A1 são bem caracterizados como relacionados à reatividade astrocítica de perfil pró-inflamatório e ao dano e, portanto, presentes por exemplo em casos de neuroinflamação e neurodegeneração, o astrócito do tipo A2 é descrito como uma célula de reparo, envolvido em processos de recuperação de tecidos danificados em isquemias (22,24,25). Dessa forma, o tipo A2 seria considerado um tipo de ativação alternativa, e que ao contrário da ativação relacionada com caráter pró-inflamatório indutor de estresse oxidativo, estaria relacionado ao controle da resposta imune (22,26).

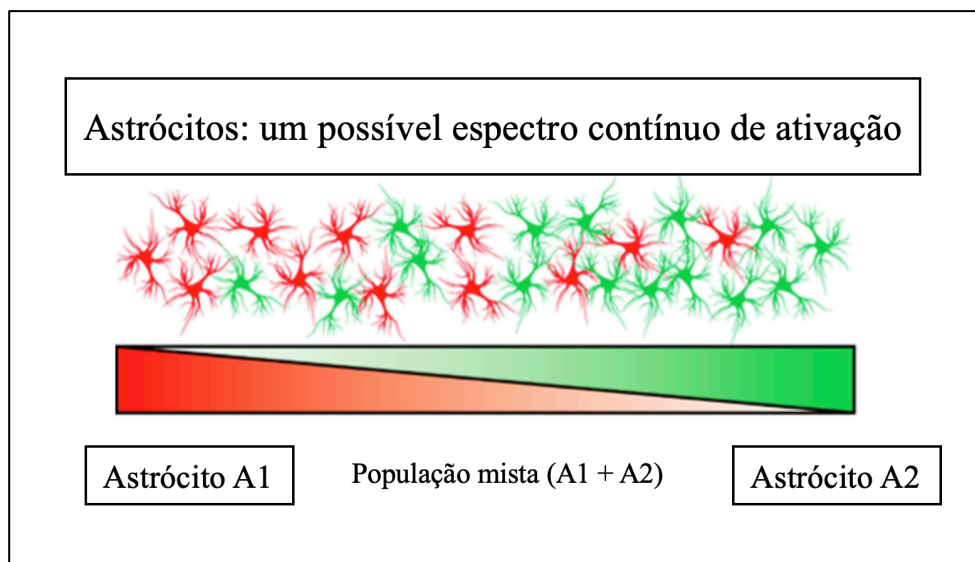


Figura 6: Possível delineamento do perfil dos astrócitos reativos. Fonte: adaptado de (24).

3. Glioblastoma: o tumor cerebral primário de maior incidência na população

Dentre os tumores primários que podem acometer o SNC, os gliomas são os tumores de ocorrência mais frequente na população adulta (27,28). O nome “glioma” justifica-se pelas semelhanças estruturais e histológicas ligadas às células da glia, das quais seriam provenientes (27). Os gliomas podem se apresentar na forma de tumores benignos e circunscritos ao local de seu surgimento, e, portanto, de baixo grau de estadiamento, ou malignos e de alto grau, com maior capacidade de difusão nos tecidos adjacentes (29). Originalmente, o diagnóstico e a classificação dos gliomas eram realizados através da análise histológica do tumor (29). A crescente evolução nas pesquisas relacionadas ao entendimento da biologia de tumores cerebrais abriu espaço para o estudo do envolvimento de vias genéticas dos diferentes graus de gliomas, além de evidenciar novos padrões moleculares com potencial de serem utilizados no diagnóstico mais acurado (27). Hoje, o diagnóstico e estadiamento dos tumores cerebrais leva em conta não só as características morfológicas do tumor mas também a presença de marcadores moleculares adicionais (30,31).

O glioblastoma (GB) é o tumor cerebral primário de maior incidência entre os adultos, representando cerca de 50% de todas as neoplasias do SNC (32,33). Classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como glioma de grau 4, o GB é caracterizado por seu crescimento altamente infiltrativo, presença de áreas necróticas e vascularização, que o garante sua elevada capacidade de angiogênese (34). A partir da atualização da

OMS realizada no ano de 2021, além da análise anatomopatológica os tumores classificados como GB apresentam a ausência de mutações na enzima isocitrato desidrogenase (IDH), sendo chamados de IDH selvagem, e mutações nos genes da helicase *ATRX* (*ATP-dependent X-linked helicase*) dentre outros, como a proteína p53 (*TP53*) ou o receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) (31,35,36) (Figura 7).

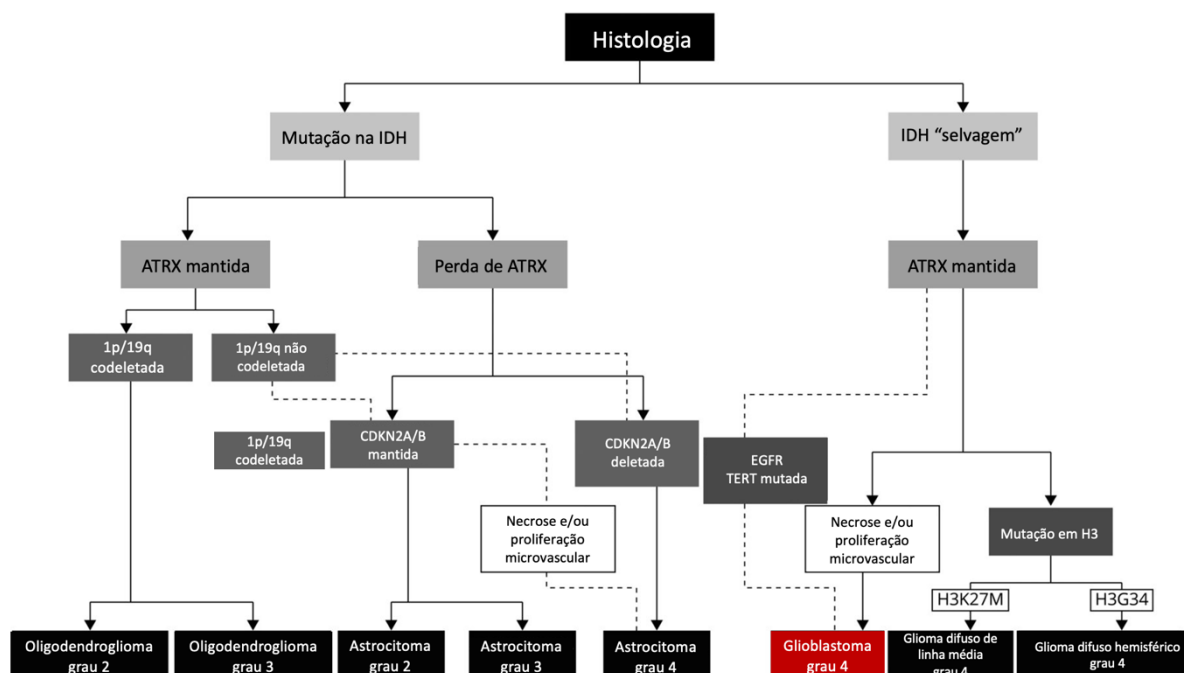


Figura 7: Fluxograma da classificação e estadiamento de gliomas de acordo com a atualização da WHO realizada no ano de 2021. O novo processo de estadiamento do tumor leva em consideração a análise da morfologia das células, a partir de um ensaio anatomopatológico, e do uso de marcadores moleculares, como a enzima IDH por exemplo. Em vermelho está demonstrada o caminho até o diagnóstico do GB, glioma de grau 4. Fonte: imagem adaptada de (36).

O protocolo convencional para o tratamento do GB inclui a ressecção cirúrgica do tumor, seguida da aplicação de radioterapia e de quimioterapia utilizando a temozolomida (TMZ), comercialmente conhecida como Temodal® (37). A escolha do TMZ como padrão ouro se dá devido à possibilidade dessa molécula de permeiar a BHE, chegando até o local do tumor, o que é um dos principais limitantes para a utilização de outros tipos de medicamentos quimioterápicos combinados a ela (38). Ainda, a presença de mutações ligadas à via da enzima O-6-metilguanina-DNA metiltransferase, abreviada como

MGMT, está intimamente ligada à eficiência da resposta do paciente frente ao tratamento com o TMZ (39).

A enzima MGMT é uma enzima de reparo do DNA, tendo a função de remoção de grupamentos metil (27). Agentes alquilantes como o TMZ promovem o aumento dos grupamentos metil com o objetivo de gerar dano ao DNA e, consequentemente, morte tumoral (39). Entretanto, a ativação da via da MGMT antagoniza a ação do TMZ, diminuindo a taxa de sucesso do tratamento quimioterápico (27). Somente 40% dos pacientes diagnosticados com GB apresentam metilação do gene promotor de MGMT e, portanto, uma resposta eficiente ao uso do TMZ, enquanto o restante dos pacientes que não apresentam a mutação não se beneficia do mesmo tratamento (40).

Em adição a isso, o manejo clínico do GB sofre também com as limitações relacionadas à ocorrência de altas taxas de resistência à terapia padrão (41,42). Essa resistência se dá devido à própria natureza heterogênea do tumor, mas também está relacionada ao caráter adaptativo que as células tumorais demonstram frente às condições ambientais proporcionadas pela radio e quimioterapia (42). Exemplo disso é que apesar do tratamento com TMZ apresentar certa eficiência inicial, a eficácia terapêutica acaba esbarrando no desenvolvimento de quimiorresistência (43). Cerca de 90% dos GBs são recorrentes nos pacientes, além de se apresentarem insensíveis ao tratamento repetido com o uso do TMZ, o que torna a terapia existente apenas paliativa (43). E o uso de tratamentos mais atuais baseados na imunoterapia, que se apresenta eficiente no tratamento de diversos outros tipos de câncer, ainda acaba gerando uma resposta terapêutica pobre em pacientes com GB (44,45).

Diante de tudo isso, o prognóstico para o GB continua extremamente desanimador, levando a uma sobrevida média dos pacientes de cerca de 12 - 14 meses após o diagnóstico inicial (37). E, apesar dos intensos esforços e pesquisas realizados nas últimas décadas em diversas áreas almejando o completo entendimento das origens biológicas e da fisiopatologia do GB, ainda existem limitações relevantes que dificultam a busca por novos tratamentos e na falta de estratégias terapêuticas alternativas à quimioterapia usual, que permanece sem atualizações desde o ano de 2005 (46). Portanto, é essencial que sejam estabelecidas novas frentes de estudos que busquem melhor compreender os mecanismos por trás da malignidade e rápida progressão desses tipos de tumores tão agressivos, na tentativa de desenvolver alternativas ao seu atual tratamento e terapias mais eficazes.

4. O papel do astrócito no microambiente do glioblastoma

Como já mencionado anteriormente, os astrócitos são reconhecidos por sua participação na resposta tecidual do cérebro frente a condições patológicas (24). Consequentemente, cada vez mais estudos são realizados com o objetivo de melhor compreender como a função astrocitária está relacionada ao desenvolvimento e progressão de diversas patologias do SNC. Diversos grupos de pesquisa trazem o papel central do astrócito na resposta neuroinflamatória relacionada a doenças de caráter neurodegenerativo ou até envolvendo situações de trauma ao tecido cerebral (24). Entretanto, apesar de ser uma população celular de grande número no SNC, a relação entre astrócitos e tumores cerebrais ainda é pouco estudada.

Mais especificamente sobre o GB, a sua elevada agressividade e malignidade é associada ao microambiente estabelecido ao redor do tumor, chamado de microambiente tumoral (no inglês, *tumor microenvironment*, abreviado como TME) (47,48). O TME consiste em uma interação complexa entre células tumorais e tipos de células não neoplásicas ao redor do tumor, incluindo células imunes, células endoteliais, fibroblastos e, no caso do GB, células gliais (49,50) (Figura 8). Apesar da expansão das células neoplásicas ser capaz de gerar o insulto que dá início à criação do nicho tumoral, os diferentes tipos de células não-transformadas presentes no meio são capazes de sofrer também uma adaptação, participando assim de um processo contínuo de tumorigênese (51). Nesse sentido, as células tumorais demonstram ter a capacidade de “educar” as células ao seu entorno, criando um ambiente totalmente favorável à progressão do tumor.

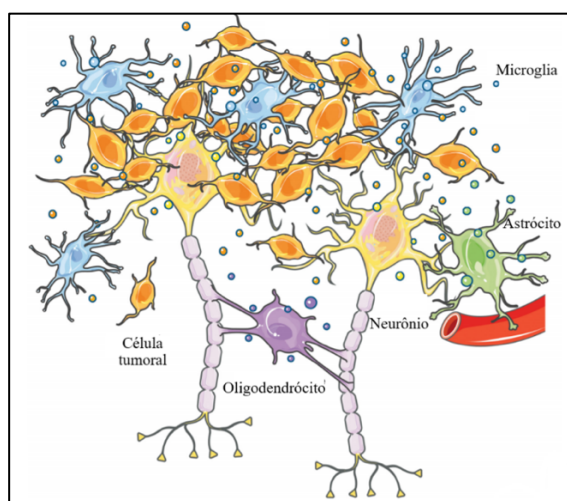


Figura 8: O microambiente tumoral do GB. As células tumorais interagem com diferentes tipos celulares, como astrócitos, neurônios, oligodendrócitos e microglia. Fonte: Ilustração adaptada de (52).

O crescimento da massa tumoral leva ao aumento da inflamação e vascularidade, o que contribui para o aumento da permeabilidade vascular, permitindo o influxo de células e substâncias da periferia para o SNC devido ao comprometimento da BHE (41). A perda da integridade da BHE resulta na entrada de células imunes periféricas, como os macrófagos (53). De fato, as principais células encontradas no microambiente tumoral são as relacionadas ao infiltrado imune. A maioria de células imunes são os macrófagos (>95% da população de células imunes), geralmente compreendendo cerca de 30% - 50% da massa tumoral e que, juntamente com a microglia residente do tecido, são denominados como macrófagos/microglia associados ao tumor (*tumor-associated macrophages/microglia* – TAM) (50,54). A diferença entre essas duas populações é relacionada de acordo com a sua ontogênese: a microglia residente do SNC tem progenitores que migraram para o SNC durante o desenvolvimento embrionário; e os macrófagos, diferenciados a partir de monócitos provenientes da medula-óssea e que extravasaram a BHE quando recrutados (55).

Os componentes celulares do microambiente tumoral podem apresentar diferentes funções, seja dando suporte ao crescimento do tumor, ou até inibindo as suas propriedades de malignidade (49) (Figura 9). A comunicação direta ou indireta entre as células do tumor e as células presentes no TME também é um importante fator a ser considerado. A troca de informações através de vesículas extracelulares, pequenas vesículas contendo proteínas de sinalização ou RNAs regulatórios, ou por meio de fatores químicos como a hipóxia relacionam-se com o estabelecimento de um ambiente condicionado e propício para o desenvolvimento do tumor (52,56).

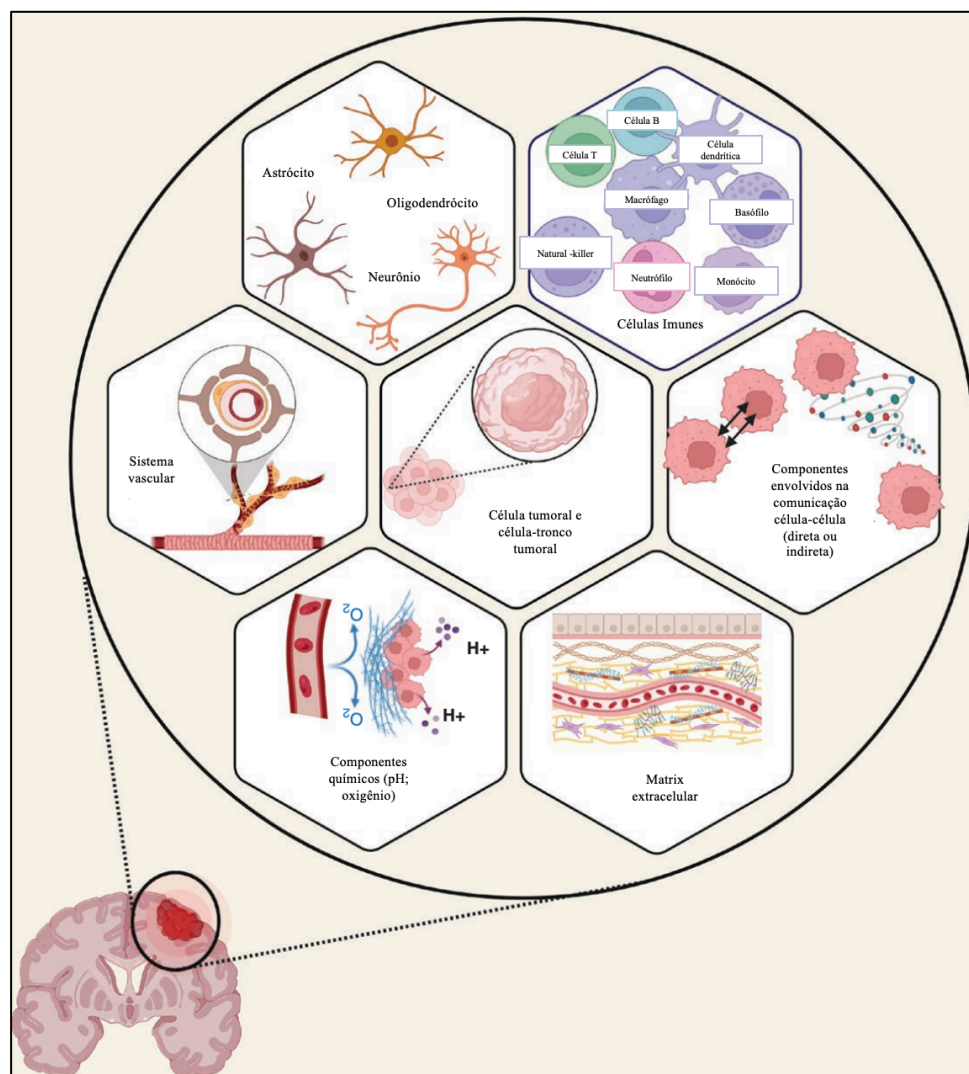


Figura 9: Representação esquemática dos componentes do TME nos gliomas/glioblastoma. O TME destes tumores é um sistema complexo, heterogêneo e interativo composto não só de células tumorais, mas também de células-tronco tumorais, células imunes, nervosas e do sistema vascular, além da matriz extracelular. A comunicação entre esses componentes se dá através de fatores diretos e indiretos, que podem alterar de forma química (pH, nível de oxigênio) o microambiente, modulando o entorno do tumor a fim de favorecer a progressão tumoral. Fonte: Imagem adaptada de (56).

Além de TAMs e células T-regulatórias, outras populações de células não-neoplásicas são encontradas em menor número, como as células precursoras de oligodendrócitos, neurônios e oligodendrócitos maduros, além de astrócitos. Porém, ainda não existem evidências suficientes que expliquem como elas contribuem no crescimento do tumor. A hipótese de que astrócitos não-neoplásicos sofram ativação através do contato com células tumorais tem surgido em alguns trabalhos na literatura nos últimos anos (54,57).

Astrócitos reativos podem modular a resposta imune por meio da sua ação ativando vias de sinalização, como a via do fator NF- κ B (fator nuclear kappa B), e também produzindo citocinas pró-inflamatórias, dentre elas interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interferon-gama (IFN- γ) e fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) (54). A liberação destes mediadores pode levar ao aumento de substâncias neurotóxicas e com potencial neuroinflamatório, como o óxido nítrico (NO), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o glutamato, neurotransmissor excitatório no SNC (54,58).

Ademais, as regiões de hipóxia, muito características no GB, além de produzirem fatores conhecidos por suas propriedades proangiogênicas, os HIFs (*hypoxia-inducible factors*), também aumentam a liberação de TGF β , que está intimamente relacionado ao recrutamento e polarização de macrófagos para o fenótipo TAM (56). A secreção de TGF β , juntamente com outras moléculas imunossupressoras como a interleucina 10 (IL-10), podem também desencadear a fenótipos reativos do astrócito relacionado ao reparo tecidual (59). Astrócitos deste fenótipo podem ser particularmente importantes na progressão tumoral por impulsionarem a invasão das células tumorais nos tecidos adjacentes, através da liberação de componentes da matriz extracelular como o colágeno e versican, e proteínas de adesão celular (por exemplo a CD44) (16).

Diante do exposto, fica claro que astrócitos possuem um relevante potencial de participação no TME de GBs. Entretanto, a similaridade molecular e fenotípica que astrócitos e células tumorais do GB compartilham dificultam a realização de estudos que visam melhor compreender a contribuição dos astrócitos na progressão de GB. Isso implica na relativa baixa quantidade de informação sobre eles e sobre como eles se comunicam com as células tumorais no SNC. Porém, é inegável que este seja um caminho fértil para o estabelecimento de novas frentes de pesquisa.

Nesse sentido, a presente tese buscou utilizar marcadores moleculares alternativos para identificar astrócitos e isolá-los das células tumorais. Para tal, foi utilizado o marcador *astrocyte cell surface antigen-2* (ACSA-2). Este marcador já foi descrito na literatura pelo seu uso em trabalhos envolvendo o isolamento e posterior cultivo primário de astrócitos provenientes de roedores (20). ACSA-2 é a abreviação para *astrocyte cell surface antigen-2* (tradução livre: antígeno de superfície celular de astrócitos-2), e os astrócitos ACSA-2⁺ também se apresentam positivos em relação a outros marcadores astrocitário clássicos, como GFAP, S100 β , ALDH1L1 e GLAST (20).

Diante do que já é bem estabelecido acerca deste complexo sistema de reatividade de astrócitos, sugere-se que o TME seja capaz de induzir astrócitos reativos de diferentes fenótipos, que divergem em expressão de genes, estrutura celular, sinalização e, por fim, em função, contribuindo não só com processos de reparo tecidual, mas também podendo estar envolvidos em mecanismos patológicos relacionados ao desenvolvimento e progressão do GB (54,57,59–61).

5. A modulação do sistema adenosinérgico no microambiente do GB

Primeiramente descrita por Geoffrey Burnstock em 1972, a sinalização purinérgica refere-se à sinalização mediada pelas purinas, especialmente ao nucleotídeo ATP e seus produtos de hidrólise, adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e, por fim, o nucleosídeo adenosina. O ATP e a adenosina, quando no meio extracelular, atuam como mensageiros ao interagir com seus respectivos receptores purinérgicos localizados na superfície dos diferentes tipos celulares, sendo capazes de sinalizar uma variedade de efeitos, como a proliferação, morte, migração, diferenciação celular e resposta imune (62–64).

A regulação dos níveis de adenosina no meio extracelular é realizada principalmente pela atividade das ectonucleotidases, enzimas localizadas na membrana das células com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, responsáveis pela hidrólise de ATP até a geração de adenosina (65). As duas principais enzimas desse sistema são a ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase1), também conhecida pela sigla CD39, e a ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT), a CD73 (63). Enquanto a NTPDase1/CD39 catalisa a hidrólise de ATP em ADP, e ADP em AMP, a ecto-5'-NT/CD73 realiza a hidrólise do AMP extracelular para a formação de adenosina (62). Os receptores purinérgicos do tipo P1 (P1Rs) representados pelos receptores A1R, A2AR, A2BR e A3R respondem especificamente à molécula de adenosina. Já os receptores do tipo P2 são subdivididos em 2 subclasses: P2XR1-7 ionotrópicos os quais respondem exclusivamente ao agonista ATP, enquanto os receptores P2YR_{1,2,4,6,11-14} metabotrópicos são sensibilizados por ATP, ADP, UTP e UDP (66). A ilustração da cascata de hidrólise completa, além dos receptores está demonstrada na figura 10.

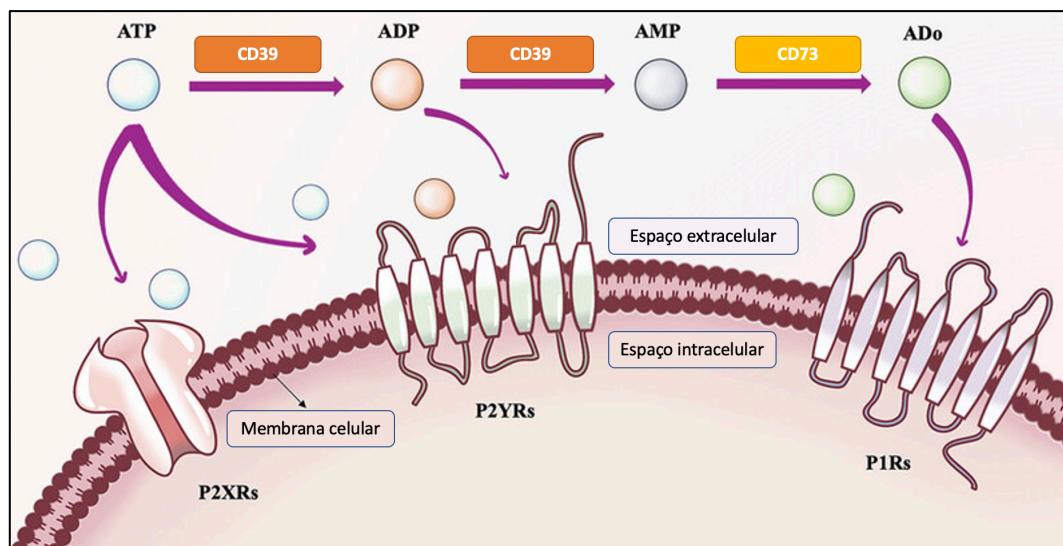


Figura 10: Representação gráfica da cascata purinérgica contendo enzimas de hidrólise de nucleotídeos/nucleosídeo e os receptores específicos. Fonte: imagem adaptada de (66).

Em condições não patológicas, o balanço entre a liberação e o consumo de ATP no meio extracelular ocorre de forma regulada e, portanto, a quantidade de nucleotídeos extracelulares permanece constante e em baixas concentrações, na ordem de nanomolar (nM) (67). No TME, há uma importante desestabilização deste eixo, favorecendo o acúmulo de ATP em níveis altíssimos que podem chegar a uma concentração na ordem de micromolar (μM) (68,69). Essa elevação é encontrada no TME da grande maioria dos tumores sólidos, e é proveniente da liberação de ATP a partir das células sob condição de estresse celular ou em processo de morte (67).

O ATP extracelular possui a capacidade de modular a resposta inflamatória (68,70,71). Além disso, por meio de sua hidrólise, ele também é substrato primário para a produção de adenosina no TME (63). Em tecidos saudáveis, o papel principal da adenosina é a proteção tecidual e a prevenção de lesões, funcionando como um contraponto às atividades pró-imunogênicas e pró-inflamatórias da molécula de ATP (67). Em contextos patológicos, como isquemia, trauma e inflamação no geral, as concentrações de adenosina extracelular são de 10 a 20 vezes maiores do que os níveis normais (67). A adenosina também se encontra aumentada no interstício de tumores cerebrais, e os níveis aumentados deste nucleosídeo estão envolvidos na resposta anti-inflamatória nos tecidos, estabelecendo um microambiente imunossupressivo que protege os tumores do ataque imune e leva à evasão imune tumoral (65,67,68).

É evidente que a sinalização purinérgica é uma via chave na progressão e malignidade de tumores (72). A alta concentração de ATP e, consequentemente, de

adenosina no TME tem a capacidade de mediar atividades pró-tumorais induzindo a proliferação, migração e invasão das células tumorais, além de favorecer a angiogênese e quimioresistência (67). Tanto as células tumorais e como as células imunes presentes no TME, como os TAMs e células T, expressam enzimas e receptores específicos para os diferentes mediadores purinérgicos (63,67). Dessa forma, a sinalização purinérgica, em especial as vias de sinalização mediada pela adenosina – a via adenosinérgica – possui um potencial relevante como um importante alvo terapêutico na busca por melhorar a efetividade do tratamento de tumores, principalmente relacionado ao fortalecimento e aperfeiçoamento da terapia imune.

As terapias antitumorais desencadeiam a liberação de altos níveis de ATP nos compartimentos extracelulares, o que funciona como um Padrão Molecular Associado ao dano (DAMP) para induzir respostas imunes tanto inatas quanto adaptativas (73). Uma vez que a adenosina é conhecida por inibir a atividade das células imunes efectoras e ativar células regulatórias imunossupressoras, suprimindo assim a resposta imune, torna-se interessante que a extensão da liberação de ATP para o compartimento extracelular e sua degradação em adenosina devam ser controladas e limitadas (73). No caso do GB, estudos pré-clínicos já mostram que a modulação da via adenosinérgica apresenta resultados promissores em revigorar a respostas antitumorais, como aumentando a resposta ao tratamento quimioterápico, diminuição do tumor e aumento da sobrevivência (68,74–76).

Dados pré-clínicos utilizando como alvo tanto a inibição da geração de adenosina como o antagonismo dos receptores adenosinérgicos mostram de forma significativa uma diminuição dos níveis de imunossupressão do TME e, assim, a inibição do crescimento tumoral (63). A fonte mais importante de adenosina extracelular é a enzima ecto-5'-NT/CD73, e a sua expressão em tumores tem sido relacionada a um aumento dos processos de migração, invasão, formação de metástases, quimioresistência e neovascularização (77). Além disso, a inibição da expressão e da atividade dessa enzima acarreta um melhor prognóstico e na diminuição do crescimento tumoral (68,74,77–79). Diante dos resultados expostos na literatura, é possível entender a relevância dessa enzima na progressão tumoral do GB.

Na literatura já é bem estabelecida a relação de enzimas e receptores sensibilizados pela adenosina na membrana das mais diversas células imunes relacionadas ao microambiente do GB. Em relação às demais células do TME, diversos estudos na literatura descrevem a presença de receptores e enzimas purinérgicos na membrana de células gliais, especificamente do astrócito, incluindo NTPDase1,

NTPDase2, P2X7R, A1R e A2AR (80–83). No entanto, ainda há limitação no entendimento do papel da sinalização purinérgica em relação não só à reatividade do astrócito em tumores cerebrais, mas também na polarização de astrócitos A1/neurotóxicos ou A2/neuroprotetores.

Diante de tudo isso, torna-se evidente o *gap* existente na literatura acerca do envolvimento da sinalização adenosinérgica na polarização de astrócitos presente no TME. Logo, o objetivo do presente trabalho foi, primeiramente, realizar uma pesquisa na literatura existente sobre o tema, delineando possíveis hipóteses que relacionassem a modulação da via adenosinérgica com a ativação dos astrócitos associados ao tumor provenientes do microambiente do GB. Subsequente a isso, o efeito da modulação da principal enzima produtora de adenosina – a CD73 – foi avaliado, no sentido de melhor compreender os efeitos da adenosina no TME após a aplicação de radioterapia, e também no perfil dos astrócitos associados ao tumor.

OBJETIVOS

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar os efeitos da sinalização adenosinérgica no microambiente estabelecido pelo glioblastoma, principalmente relacionado à influência dos astrócitos associados ao tumor na progressão tumoral.

1. Realização de análise crítica da literatura científica a fim de avaliar a participação da sinalização adenosinérgica na polarização astrocítica e na promoção do crescimento de GB;
2. Determinação do efeito da adenosina na resistência *in vitro* ao tratamento radioterápico, através do bloqueio farmacológico da enzima CD73 em diferentes linhagens celulares de glioblastoma;
3. Investigação do impacto do microambiente de GB sobre a reatividade astrocitária e as consequências dessa modulação sobre a progressão tumoral utilizando a ferramenta de *Single cell RNA-seq*.

ARTIGO CIENTÍFICO 1**ADENOSINERGIC SIGNALING AS A KEY MODULATOR OF THE GLIOMA MICROENVIRONMENT AND REACTIVE ASTROCYTES**

Gabriela N. Debom¹⁺, Dominique S. Rubenich¹⁺ and Elizandra Braganhol^{1,2*}

¹Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

²Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Instituto de Cardiologia - Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, Brazil

⁺These authors have contributed equally to this work

^{*}Correspondence: ebraganhol@ufcspa.edu.br

**Manuscrito de revisão publicado no periódico Frontiers in Neuroscience, Section
Neuropharmacology**

DOI: 10.3389/fnins.2021.648476

Endereço eletrônico da publicação na revista:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.648476/full>

Fator de impacto: 3.707.



Adenosinergic Signaling as a Key Modulator of the Glioma Microenvironment and Reactive Astrocytes

Gabriela N. Debom^{1†}, Dominique S. Rubenich^{1†} and Elizandra Braganhol^{1,2*}

¹ Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, ² Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Instituto de Cardiologia - Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Rui Daniel Prediger,
Federal University of Santa Catarina,
Brazil

Reviewed by:

Peter McCormick,
Queen Mary University of London,
United Kingdom
Rodrigo A. Cunha,
University of Coimbra, Portugal

*Correspondence:

Elizandra Braganhol
ebraganhol@ufcspa.edu.br

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 31 December 2020

Accepted: 03 December 2021

Published: 05 January 2022

Citation:

Debom GN, Rubenich DS and
Braganhol E (2022) Adenosinergic
Signaling as a Key Modulator of the
Glioma Microenvironment
and Reactive Astrocytes.
Front. Neurosci. 15:648476.
doi: 10.3389/fnins.2021.648476

Astrocytes are numerous glial cells of the central nervous system (CNS) and play important roles in brain homeostasis. These cells can directly communicate with neurons by releasing gliotransmitters, such as adenosine triphosphate (ATP) and glutamate, into the multipartite synapse. Moreover, astrocytes respond to tissue injury in the CNS environment. Recently, astrocytic heterogeneity and plasticity have been discussed by several authors, with studies proposing a spectrum of astrocytic activation characterized by **A1**/neurotoxic and **A2**/neuroprotective polarization extremes. The fundamental roles of astrocytes in communicating with other cells and sustaining homeostasis are regulated by purinergic signaling. In the CNS environment, the gliotransmitter ATP acts cooperatively with other glial signaling molecules, such as cytokines, which may impact CNS functions by facilitating/inhibiting neurotransmitter release. Adenosine (ADO), the main product of extracellular ATP metabolism, is an important homeostatic modulator and acts as a neuromodulator in synaptic transmission via P1 receptor sensitization. Furthermore, purinergic signaling is a key factor in the tumor microenvironment (TME), as damaged cells release ATP, leading to ADO accumulation in the TME through the ectonucleotidase cascade. Indeed, the enzyme CD73, which converts AMP to ADO, is overexpressed in glioblastoma cells; this upregulation is associated with tumor aggressiveness. Because of the crucial activity of CD73 in these cells, extracellular ADO accumulation in the TME contributes to sustaining glioblastoma immune escape while promoting **A2**-like activation. The present review describes the importance of ADO in modulating astrocyte polarization and simultaneously promoting tumor growth. We also discuss whether targeting of CD73 to block ADO production can be used as an alternative cancer therapy.

Keywords: tumor microenvironment, glioblastoma, tumor-associated astrocyte, **A2**-like astrocyte, adenosine, CD73

INTRODUCTION

In the last few years, astrocytes have received increased attention, with many studies aimed at in-depth understanding of their functions in the healthy brain and in central nervous system (CNS) pathologies (Khakh and Sofroniew, 2015; Escartin et al., 2019). Reactive astrocyte responses have been described as detrimental in different pathologies, including neuroinflammatory and neurodegenerative diseases and brain tumors (Liddel et al., 2017).

In this regard, glioblastoma (GB) is the most common and aggressive primary tumor in the CNS (Huse and Holland, 2010). Although many researchers have attempted to develop new therapeutic strategies for GB, patients continue to show a short median survival time (Huse and Holland, 2010; Nørøxe et al., 2016; Di Carlo et al., 2019). The tumor microenvironment (TME) contains not only GB cells, but other normal cells such as immune cells and astrocytes that contribute to cancer progression and may shape the tumor cell response to radio-chemotherapy (Wang et al., 2017; Najafi et al., 2019; Wei et al., 2020). Therefore, GB-astrocyte crosstalk may explain the poor prognosis of patients by improving the understanding of how astrocytes contribute to GB progression, which can provide new biological treatment targets (Brandao et al., 2019).

The presence of extracellular adenosine triphosphate (ATP) and its hydrolysis products, namely ADP, AMP, and adenosine (ADO), triggers the purinergic signaling cascade (Burnstock, 2007; Di Virgilio et al., 2009). The biological effects of extracellular purines and pyrimidines are mediated by P1 and P2 purinoceptors (Zarrinmayeh and Territo, 2020). ADO mediates the sensitization of the P1 receptors named A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R, and A₃R (Fredholm et al., 2011). The P2 family is subdivided into ionotropic P2X (1–7) and metabotropic P2Y (P2Y₁, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) receptors (Burnstock, 2007; Di Virgilio et al., 2018). ATP plays a dual role in the TME by exhibiting anti- or pro-tumor effects depending on its extracellular concentration, the presence of purinergic receptors, and the combined activity of ectonucleotidases, such as ecto-nucleoside-triphosphate-diphosphohydrolases (E-NTPDases) and CD73, which metabolize ATP to ADO in the extracellular space (Allard et al., 2016, 2017). The amplitude of the agonist effects of ATP and its metabolite ADO is critical for maintaining the TME, as these signaling molecules have tumor-promoting activities in immune escape, angiogenesis, cell proliferation, and migration (Allard et al., 2016, 2020; Di Virgilio et al., 2016, 2018). In addition, extracellular ATP and ADO have important roles in neurodegenerative, cognitive, and psychiatric disorders. ADO modulates synapse function by altering neuron firing in different brain regions, contracting the local vasculature, and exerting immune/neuromodulatory effects (Dunwiddie, 1985; Redzic et al., 2010; Hinton et al., 2014; Allard et al., 2016; Di Virgilio et al., 2016). In this regard, selective participation of purinergic signaling in astrocytes has been well-established and recently reviewed (Illes et al., 2019; Agostinho et al., 2020; Lopes et al., 2021). However, astrocytic polarization has recently gained attention, although little is known about the contribution of extracellular purines to A1/neurotoxic or A2/neuroprotective

astrocyte polarization. The present review summarizes the available evidence on the participation of purinergic signaling, mostly involving ADO, in modulating the astrocyte phenotype in the TME and its further impact on GB progression.

ROLE OF REACTIVE ASTROCYTES IN THE BRAIN

Astrocytes are abundant and complex glial cells in the CNS and are key elements involved in brain homeostasis (Sofroniew and Vinters, 2010). Astrocytes establish and maintain the blood–brain barrier with their cell end-feet (Ballabh et al., 2004; Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Moreover, these glial cells are tightly integrated into neural networks, participating in synaptic transmission regulation via uptake of the neurotransmitter glutamate, and communicate with neighboring cells through Ca²⁺ signals (Clarke and Barres, 2013). Astrocytes form a fundamental part of synaptology together with the pre- and postsynaptic neuronal compartments as part of the multipartite synapse (Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

Astrocytes undergo a set of morphological changes in their normal state in response to CNS insults (Wilhelmsson et al., 2006; Sofroniew, 2009; Burda et al., 2016; Liddel et al., 2017). The reactivity of astrocytes is a universal reaction that occurs in response to cerebral injury. Under stress condition, these cells assume a wide range of new characteristics in brain, becoming hypertrophic, upregulating intermediate filaments such as nestin, vimentin, and glial fibrillary acidic protein, and in some cases, activating proliferation process (Pekny and Pekna, 2014; Boccazzi and Ceruti, 2016; Guan et al., 2018). Reactive astrocytes are observed in the brains of patients suffering from various pathological conditions, including trauma, infection, neurodegeneration, and ischemia (Zamanian et al., 2012).

Because of their variable roles in different pathological conditions, reactive astrocytes remain controversial. Although they are recognized as the pathological hallmark of CNS structural lesions, previous studies reported that, in addition to supporting CNS recovery, astrocytes could inhibit axon regeneration after CNS injury and produce proinflammatory cytokines that exacerbate neuroinflammatory damage (Sofroniew and Vinters, 2010; Zamanian et al., 2012; Liddel et al., 2017). Recently, astrocytes were shown to react to insults in an activation spectrum, similar to that observed in macrophages and microglia in the CNS, assuming two opposite phenotypes in a spectrum of polarization: A1-astrocyte and A2-astrocyte (Liddel et al., 2017; Figure 1A). A1-astrocytes are neurotoxic and associated with injuries and neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's disease (Goetzl et al., 2018; Carter et al., 2019; Grimaldi et al., 2019), Parkinson's disease (Hinkle et al., 2019), and Huntington's disease (Diaz-Castro et al., 2019). Moreover, A1-astrocyte polarization has been associated with normal brain aging, which supports the involvement of A1-astrocytes in neuroinflammation (Clarke et al., 2018). In contrast, A2-astrocytes tend to be neuroprotective and promote neuronal survival (Singh et al., 2019). Therefore, once induced, these two extremes of cell phenotypes diverge in gene expression, cell

structure, signaling, and overall function (Escartin et al., 2019). The plasticity of astrocytes that enables them to exert diverse responses to injuries has become a topic of research interest, representing an opportunity to explore specific therapeutic strategies for brain pathologies including GB (Pavlou et al., 2019).

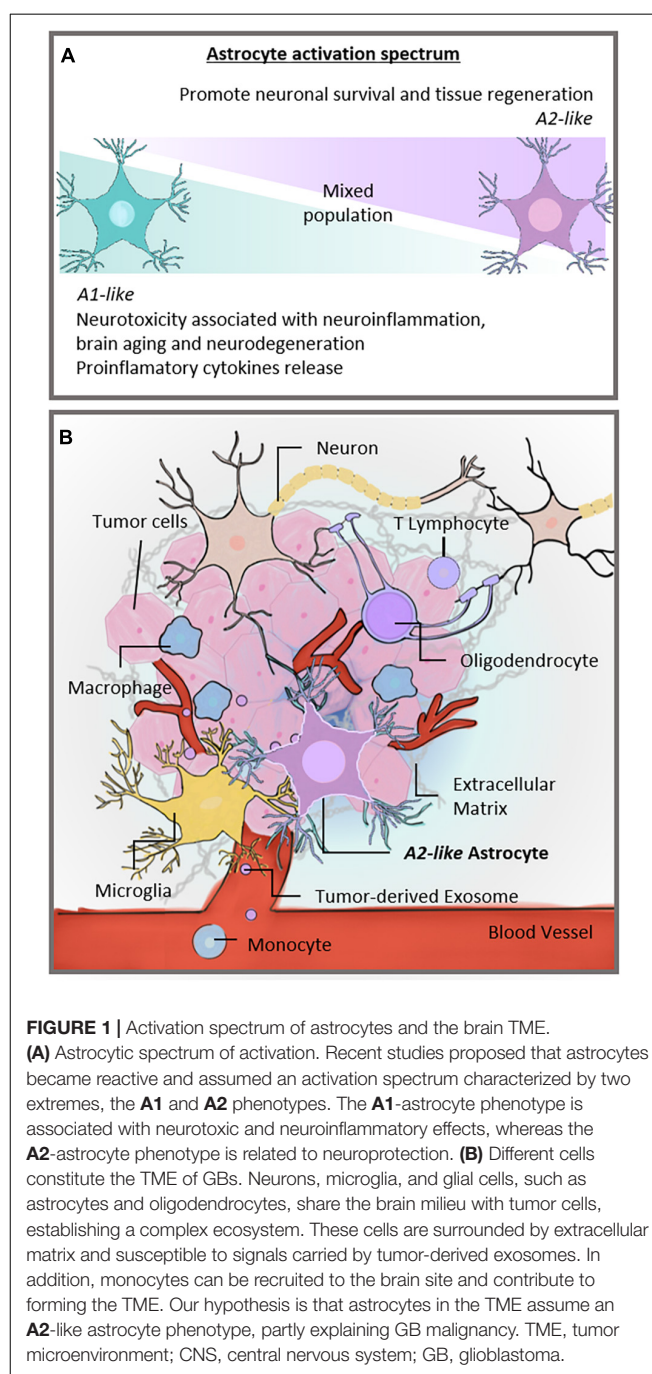
TUMOR MICROENVIRONMENT OF THE BRAIN: THE IMPORTANCE OF MICROGLIA-ASTROCYTE CROSSTALK

Glioblastoma is considered as the most common and aggressive primary brain tumor, accounting for more than 40% of neoplasms of the CNS (Huse and Holland, 2010; Di Carlo et al., 2019). Clinically, gliomas are divided into four degrees, grade I as benign, which show slow proliferation rate and good prognosis after surgical removal; grade II gliomas, which are slightly more severe and capable of progressing to higher grades; and grade III and IV gliomas, which are the most aggressive and characterized by a high rate of cell proliferation, spreading rapidly through the normal parenchyma of the CNS (Nørøxe et al., 2016; Verano-Braga et al., 2018). Moreover, GB (grade IV glioma) exhibits higher angiogenesis and necrosis when compared to grade I–III gliomas, resulting in a short survival time of approximately 15 months in patients (Huse and Holland, 2010; Di Carlo et al., 2019). The first-choice treatment for GB involves surgical removal combined with radio-chemotherapy with temozolomide (TMZ), a DNA-alkylating agent (Stupp et al., 2005).

The TME directly influences tumor growth and proliferation. The GB microenvironment comprises infiltrating and resident immune cells, vascular cells, and glial cells such as astrocytes and microglia (Chen and Hambardzumyan, 2018; **Figure 1B**). The interactions of tumor cells with non-malignant cells in the TME occur via direct cell-cell communication, shape tissue reorganization, and tumor ecosystem modulation (Tirosh and Suvà, 2018), and impact the biology and aggressiveness of GB (Azambuja et al., 2020a).

Tumor-associated macrophages are the dominant infiltrating immune cell population in the tumor mass, constituting ~30–40% of total cells of the GB bulk (Hambardzumyan et al., 2016; Chen and Hambardzumyan, 2018). Microglia, as the resident innate immune cell of the CNS, is also abundant in the GB TME (Charles et al., 2011). Both macrophages and microglia display an alternative phenotype of activation or M2-like polarization when subverted by the tumor signals associated with growth, invasion, and angiogenesis, in addition to contributing to the establishment of an immunosuppressive environment (Da Fonseca et al., 2016; Placone et al., 2016; Matias et al., 2017; Roesch et al., 2018). In addition to macrophages and microglia, lymphocytes are recruited to the tumor site, a relevant part of the TME. A higher proportion of CD4⁺ than CD8⁺ cells in the TME is associated with a high tumor grade and worst prognosis (Giering et al., 2017; Strepkos et al., 2020).

Other non-neoplastic cells are found in smaller numbers, such as oligodendrocyte precursor cells and neurons. Although there is limited evidence explaining the contribution of glial cells to immunosuppression, these cells have the potential to



alter the TME (Henrik Heiland et al., 2019). Communication among these different cell types is an important process carried out by the exchange of information via extracellular vesicles, including exosomes, containing signaling proteins or regulatory RNAs (Rajendran et al., 2014).

The interaction of GB cells with astrocytes around the peritumoral area has become a topic of great interest. Reactive astrocytes exhibit intimate crosstalk with activated microglia and similar secreted factors such as interleukin-1 β , interleukin-6, and nitric oxide, which are related to GB progression

(Liddel and Barres, 2017; Jha et al., 2019) and a poor prognosis for patients (Mega et al., 2020). This relationship may also be essential for the immune aspects of the brain tumor TME. Placone et al. (2016) suggested that astrocytes promote the proliferation and invasion of tumor cells and decrease chemotherapeutic efficiency by protecting malignant cells from apoptosis (Chen et al., 2015). Moreover, astrocytes cleave the inactive form of matrix metalloproteinase-2 (pro-MMP2) to matrix metalloproteinase 2, which is involved in tumor invasiveness (Le et al., 2003). Brandao et al. (2019) demonstrated that astrocytes are involved in GB progression, identifying reactive astrocytes around the tumor as tumor-associated astrocytes characterized by high proliferation, migration, and invasion to support tumor cell survival. Studies have demonstrated that astrocytes release exosome vesicles (EVs) containing promoters of angiogenesis and immune modulation, further supporting the novel capabilities of astrocytes in communicating with the TME (Proia et al., 2008; Hajrasouliha et al., 2013). Additionally, Leiss et al. (2020) highlighted astrocyte-glioma crosstalk, indicating that platelet-derived growth factor is a potential astrocytic biomarker associated with a poor prognosis in patients with GB.

Astrocytes in the peritumoral areas can be affected by GB, causing leakage through the blood-brain barrier and contributing to the entrance of a set of immune cells at the tumor site (Watkins et al., 2014; Nørøxe et al., 2016). The recruitment of new tumor-associated macrophages and regulatory T-cells to the TME and overall immunosuppressive microenvironment are crucial for GB development and progression and are factors that affect the poor response of this tumor to conventional immunotherapy (Joyce and Fearon, 2015; Broekman et al., 2018; Pasqualini et al., 2020).

In summary, tumors control their microenvironment to establish an immunosuppressed niche. The tumor capacity to “educate” non-transformed cells in the TME contributes to escape from surveillance by avoiding an effective immune response against tumor and preventing the recruitment of other adaptive and innate immune cells that may inhibit tumor growth (Da Fonseca et al., 2016). Therefore, tumor cells can effectively alter the immune system from a protective to a detrimental state and favor tumor progression (Chen and Hambarzumyan, 2018). In accordance with these observations, increasing evidence has revealed that astrocytes contribute to the immunosuppressive characteristics of the TME, and that microglia-astrocyte crosstalk is an important subject that requires further study (Placone et al., 2016). Besides that, the discussion about astrocytic activation states into the GB microenvironment needs to be amplified in order to comprehend the complexity of GB phenotypes and the diversity of the tumor ontogeny (Nørøxe et al., 2016).

PURINERGIC SIGNALING IN ASTROCYTES: FROM ADENOSINE TRIPHOSPHATE TO ADENOSINE

ATP is known for its classic function in energy metabolism. However, in the extracellular environment, this nucleotide is

crucial for the maintenance of physiological functions including neuro/gliotransmission and immune/inflammatory responses (Khakh and Burnstock, 2009). ATP can be metabolized to ADO by ectonucleotidases, such as CD39 (NTPDase1) and CD73 (ecto-5'-nucleotidase), which play key roles by producing active hydrolyzed products and recycling nucleotides (Burnstock, 2007; Allard et al., 2017). Adenosine deaminase (ADA) is responsible for converting ADO to inosine, and both ADO and inosine can be transported across cellular membranes through nucleoside transporters (ENTs) (Boswell-Casteel and Hays, 2017; Pastor-Anglada and Pérez-Torras, 2018; **Figure 2A**).

ATP is considered as a danger-associated molecule that is released by injured cells into the extracellular medium during inflammation (Minkiewicz et al., 2013). In addition, ATP can be released by astrocytes through specific and regulated pathways such as exocytosis (Pangršič et al., 2007), vesicular release (Coco et al., 2003; Zorec et al., 2016), or diffusion through ion channels, specifically pannexin/connexin channels (Stout et al., 2002; Suadicani et al., 2012). Increasing evidence has demonstrated that both astrocytes and tumor cells express purinergic receptors and purine-metabolizing enzymes, which can trigger a set of biological effects in the CNS (Wink et al., 2003, 2006; Rodrigues et al., 2015; Azambuja et al., 2019a; Illes et al., 2019; Campos-Contreras et al., 2020). In line with this, ATP and ADO signaling may have significant impacts on therapies for brain tumors such as GB (Azambuja et al., 2019a,b, 2020c).

Astrocytes release various gliotransmitters, such as glutamate, D-serine, and ATP (**Figure 2B**). Notably, after activation, a single astrocyte releases both glutamate and ATP in the multipartite synapse, leading to biphasic modulation of synaptic transmission (Ma et al., 2016). Extracellular ATP is well-known for its role in mediating astrocytic Ca^{2+} waves (Guthrie et al., 1999) as well as in astrocyte-mediated wound healing in glial scars (Singh et al., 2015). Moreover, the catabolism of ATP likely represents the source of ADO inactivating postsynaptic $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ (Agostinho et al., 2020), as well as the mechanism by which the release of gliotransmitters by astrocyte exerts neuronal feedback actions and eventually modulates synaptic transmission and plasticity (Illes et al., 2019; Scemes et al., 2019).

As described above, microglia-astrocyte crosstalk is instrumental to CNS functions and determines the fate of astrocytes and microglia activation (Jha et al., 2019). Microglial activation by lipopolysaccharide, a TLR4 agonist, induces the release of ATP, which in turn stimulates P2Y_1 in astrocytes, leading to the release of glutamate and further modulation of neuronal activity (Pascual et al., 2012). Cortical astrocytes respond to extracellular ATP under *in vitro* experimental conditions, and astrocytic activation into a reactive phenotype, including cell proliferation and glial fibrillary acidic protein remodeling, depends on ATP levels (Suadicani et al., 2012). Similarly, Ficker et al. (2014) found a correlation between P2X_7 receptor sensitization and the development of inflammatory and neuropathic pain, possibly involving oxidative stress.

ATP can be converted into its breakdown product ADO in the extracellular environment by ectonucleotidases. A previous study reported a purinergic enzyme profile for E-NTPDases

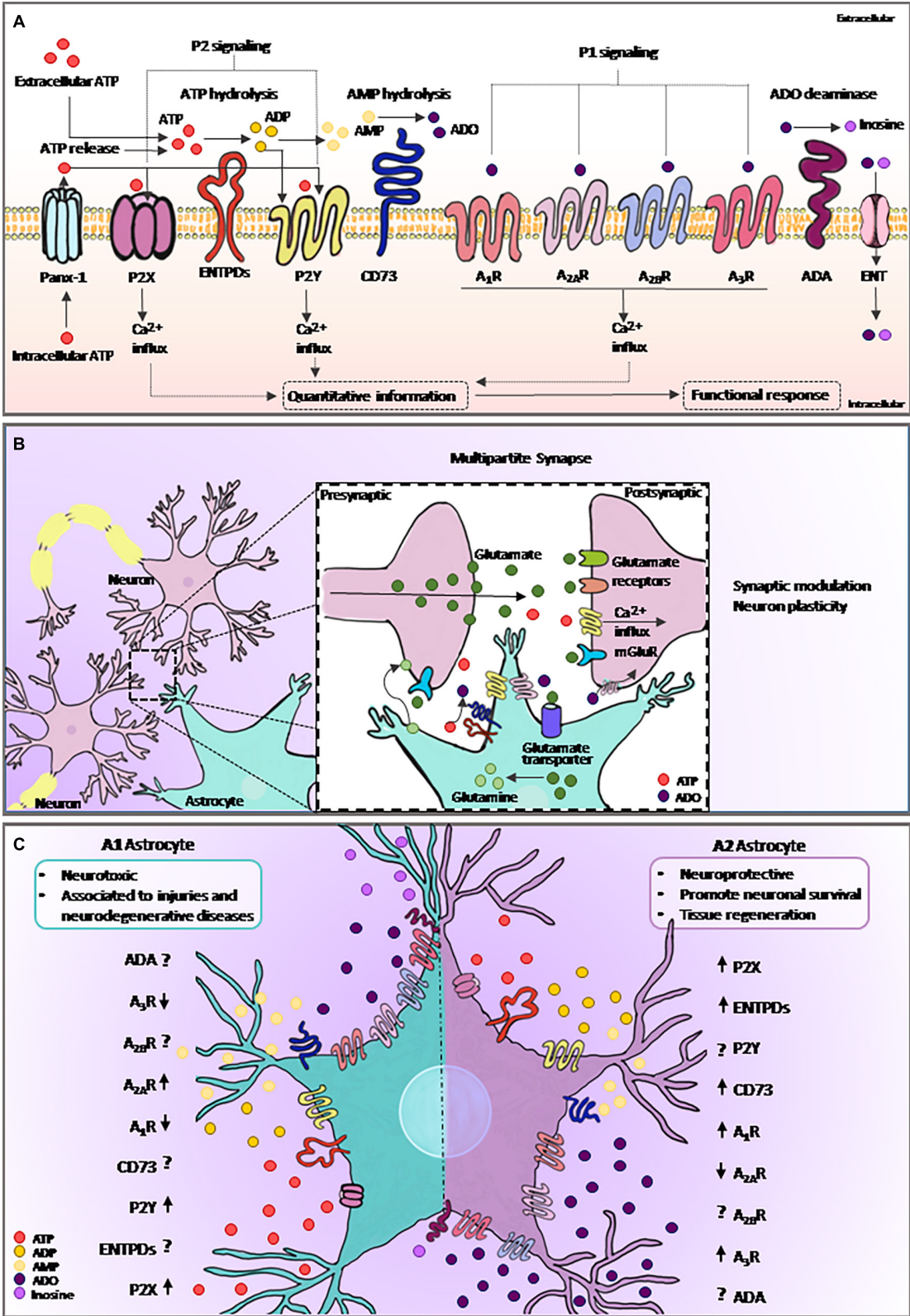


FIGURE 2 | Purinergic signaling and astrocytes. **(A)** Intracellular ATP is released from astrocytes via specific channels such as Panx-1. Extracellular ATP and its breakdown products, ADP and ADO, are agonists of purinergic receptors, and the extracellular levels of nucleotides and nucleosides are regulated by

(Continued)

FIGURE 2 | Ectonucleotidases such as ENTPDs and CD73. ADA catalyzes irreversible deamination of ADO into inosine. ADO can return to the intracellular space through specific transporting channels, named as ENTs. Purinergic signaling plays an important role in many biological processes, including astrocytic functions. Both ATP released from astrocyte and from neighboring cells can selectively bind to P2 receptors, whereas ADO binds to P1 receptors. Activation of purinergic receptors in astrocytes can induce several functional responses, including the regulation of neural communication and immune/inflammatory responses. **(B)** ATP is an important gliotransmitter released by astrocytes in combination with glutamate. The multipartite synapse is a key mechanism of neuron communication and plasticity. **(C)** Astrocytes became reactive in response to injury. Here, we show the mechanism by which the elements of purinergic signaling are expressed or face this response. The graphical representation of purinergic signaling shows **A1**-astrocyte in the left panel and **A2**-astrocyte in the right panel. Arrows represent the described modulation of the elements found in reviewing the literature on the topic, and the interrogation points are represented as components without data already described in the literature. ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; ADO, adenosine; Panx-1, pannexin channel 1; ADA, adenosine deaminase; ENTPDs, ecto-nucleoside-triphosphate-diphosphohydrolases; ENT, equilibrative nucleoside transporter.

and CD73 in rat astrocytes, demonstrating that extracellular ATP is rapidly converted to ADP, and ultimately, to AMP by NTPDase2, an ectoenzyme predominantly expressed in these cells (Wink et al., 2003, 2006). As high levels of extracellular ATP are neurotoxic, NTPDase2 activity in astrocytes may protect neurons from damage, in addition to promoting ADO production (Wink et al., 2006). In addition, CD73 overexpression was observed in reactive astrocytes as a possible protective astrocyte repertoire during the symptomatic phase of an experimental autoimmune encephalomyelitis model, demonstrating the relationship between the ATP/ADO ratio and acute inflammatory situations (Lavrња et al., 2015). CD73 activity is also involved in astrocyte adhesion and migration, possibly via interactions with the extracellular matrix (Adzic et al., 2017; Adzic and Nedeljkovic, 2018).

In general, ADO is directly related to cellular processes such as viability and adaptability (Cunha, 2016). However, under pathological conditions, the ADO concentration acts as a risk factor for CNS pathologies, including the development/progression of neurodegenerative diseases and brain tumors (Cunha, 2016; Azambuja et al., 2020e). Thus, studies have focused on investigating astrocyte plasticity to understand the role of ADO in pathological situations.

The ability of astrocytes to detect patterns of neural activity is attributed to the fine adjustment of astrocyte signaling, which in turn modulates synaptic transmission and contributes to the most diverse forms of synaptic plasticity (Covelo and Araque, 2018; Mederos et al., 2019). Brain injuries caused by trauma or stroke increase extracellular ADO levels (Haskó et al., 2005; Fusco et al., 2018). In this regard, the P1 receptors A₁R and A_{2A}R are located at synapses, particularly at excitatory ones, and cross-communication between astrocytes and neurons regulates the neural networks (Rebola et al., 2008; Illes et al., 2019). Indeed, astrocytes depress excitatory synapses and potentiate inhibitory synapses by activating A₁R and A_{2A}R, respectively (Martin-Fernandez et al., 2017). Interestingly, astrocytic A_{2A}R modulates glutamate-mediated signaling through a variety of mechanisms (Rebola et al., 2008). For example, A_{2A}R influences glutamate and GABA uptake by neurons, and selective A_{2A}R activation in astrocytes inhibits glutamate uptake by decreasing Na⁺/K⁺-ATPases (NKAs) and the $\alpha 2$ subunit of NKA (Matos et al., 2013). Based on these results, A_{2A}R overexpression observed in astrocyte reactivity contributes to the progression of brain diseases, making this receptor a potential therapeutic target for Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Sandhoff disease, as previously reported and extensively revised (Ohta et al., 2006;

Matos et al., 2015; Scharbarg et al., 2016; Basanta and Anderson, 2017; Liddelow and Barres, 2017; Quail and Joyce, 2017; Wesseling and Capper, 2018; Allen et al., 2019; Okada et al., 2019; Schalla and Stengel, 2019; Azambuja et al., 2020d; data summarized in **Table 1**).

Although A_{2A}R has shown a protagonist effect in studies of neurodegenerative disease, some neuroprotective actions have been reported for A_{2B}R sensitization. Moidunny et al. (2012) observed a positive correlation among astrocytic leukemia inhibitory factor protein expression, A_{2B}R sensitization, and further Gq/11-PLC-PKC-MAPK-NF κ B cascade activation, supporting the neuroprotective effect of A_{2B}R under excitotoxic conditions. In contrast, in an ischemia model, the use of A_{2B}R antagonists (MRS1754 and PSB603) partially limited astrocyte proliferation, thus preventing neurodegenerative effects on neurons (Fusco et al., 2018).

In addition to the relation with astrocytes, purinergic signaling is also an important player in the microglial reactivity. In the CNS, the P2X7 receptor is preferentially located on microglia (Illes, 2020). Besides that, several authors have also been reported the expression of P1 receptors in microglia, describing ADO as a crucial modulator of microglia phenotype of CNS pathologies, including cancer (Hammarberg et al., 2003; Synowitz et al., 2006; Ferreira-Silva et al., 2020).

Extracellular ADO is ultimately converted to inosine by ADA, which exerts many biological regulatory functions such as protecting the brain against neuronal diseases. A very informative study applied an experimental strategy for profiling fibroblasts and inducing neuronal progenitor-derived human-induced astrocytes from patients with amyotrophic lateral sclerosis, to evaluate dysfunctional astrocytic energy metabolism. The investigation revealed that induced human astrocytes had reduced ADA activity, making the astrocytes more susceptible to ADO-induced toxicity. In contrast, restoration of ADA activity and/or supplementation with inosine stimulated the aerobic state of astrocytes, increased the bioenergetic capacity, and decreased neurotoxicity, thereby demonstrating a beneficial therapeutic approach (Allen et al., 2019).

Considering the collective results of previous studies, A₁R, A_{2B}R, and ADA activity in astrocytes is crucial for neuronal maintenance and may contribute to the **A2**/neuroprotective profile of astrocytes. In contrast, overexpression of A_{2A}R disrupts adenosinergic homeostasis and is involved in neuronal degeneration, representing a classic condition of **A1**/neurotoxic activation in astrocytes. These data are summarized in **Table 1**. An imbalance of the adenosinergic pathway is common

TABLE 1 | Purinergic signaling in astrocytes.

Nucleotide or nucleoside/receptor/channel/enzyme	Biological process	Experimental system	Effect	References
ATP	Neuroinflammation	<i>In vitro</i>	Induction of astrocytic reactivity by ATP	Adzic et al., 2017
ATP	Neuron and glia plasticity	<i>In vitro</i>	ATP released as an activation process of astrocytes	Singh et al., 2015
ATP/ADO	Neuron and glia plasticity	<i>In vivo</i>	ATP/ADO are released downstream of the GABA-mediated astrocyte Ca^{2+} signal	Covelo and Araque, 2018
Panx1	Neuron and glia plasticity	<i>In vivo</i>	Related to ATP release in astrocytes and better outcome of seizures	Scemes et al., 2019
P2X7	Neuroinflammation and pain	<i>In vivo</i>	P2X7 receptors as a key mechanism in inducing pain during inflammation	Ficker et al., 2014
CD73	Cell adhesion/migration	<i>In vitro</i>	Upregulation of CD73	Adzic and Nedeljkovic, 2018
CD73	Neuroinflammation	<i>In vivo</i>	Neuroprotection of CD73 overexpression during acute inflammation	Lavrnja et al., 2015
ADO	Neuron and glia plasticity	Cerebral cortex human astrocytes	Inhibition of astrocyte proliferation independent of P1 receptor sensitization	Marcelino et al., 2020
P2Y ₁ + A _{2A} R	Neuron and glia plasticity	<i>In vivo</i>	ATP/ADO release impact synaptic plasticity and enhance cognitive functions	Mederos et al., 2019
rENT-1	Neurodegeneration	<i>In vitro</i>	Neuroprotection role of ADO after hypoxia and glucose deprivation	Redzic et al., 2010
ENT1	Neurodegeneration	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i>	Reduced GFAP expression in astrocyte cultures ENT1-knockdown, and in ENT1 ^{-/-} mice	Hinton et al., 2014
AR	Neuron and glia plasticity	<i>In vivo</i> (<i>Drosophila</i>)	Neuromodulation by ATP release from astrocytes and subsequent activation of AR on dopaminergic neurons	Ma et al., 2016
A ₁ R	Neuron and glia plasticity	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i>	Activation of A ₁ R receptors is increased by wakefulness	Schmitt et al., 2012
A ₁ R	Neuron and glia plasticity	<i>In vivo</i>	Astrocytic ATP and ATP-derived adenosine involved in the cognitive deficits following sleep deprivation	Florian et al., 2011
A ₁ R	Neuroinflammation	<i>In vivo</i>	Induction of inflammation via LPS and control of sleep	Nadjar et al., 2013
A ₁ R	Neuroinflammation	<i>In vivo</i>	Neuroprotective effects	Kong et al., 2020
A ₁ R – A _{2A} R	Neuron and glia plasticity	<i>In vivo</i>	Neuromodulation by regulating specific synapses via ATP/ADO	Martin-Fernandez et al., 2017
A _{2B} R	Neuron and glia plasticity	<i>In vitro</i>	Role of ADO in neuronal protection	Moidunny et al., 2012
A _{2A} R	Neuron and glia plasticity	<i>In vitro</i>	Increase in extracellular glucose concentration induces astrocytic ADO release, regulating the need for sleep	Scharborg et al., 2016
A ₁ R-A _{2A} R	Neuroinflammation	Surgical specimens from glioma patients	Neuroprotective and anti-convulsive effect	Huang et al., 2016
A _{2A} R	Neurodegeneration	<i>In vivo</i>	Neuroprotection after A _{2A} R antagonism using MSX-3	Cerri et al., 2014
A _{2A} R	Neuron and glia plasticity	<i>In vivo</i>	Interaction between A _{2A} R and D2-dopamine receptors	Cervetto et al., 2018
A _{2A} R	Neuron and glia plasticity	<i>In vivo</i>	Dysfunction of astrocytic A _{2A} R triggers the crosstalk between astrocyte and neuron	Matos et al., 2015
A _{2A} R	Neuroinflammation	<i>In vitro</i> + <i>In vivo</i>	Astrocytic activation via A _{2A} R as an important mediator of inflammation mediated by microglial activation	Ogawa et al., 2018
A _{2A} R	Neuron and glia plasticity	<i>In vitro</i>	Astroglial glutamatergic transmission	Okada et al., 2019
A _{2A} R	Neurodegeneration	<i>In vitro</i>	Overexpression upregulates astrocytic genes related to aging and astrocytic reactivity	Paiva et al., 2019
A _{2A} R – A _{2B} R	Neuron and glia plasticity	<i>In vitro</i>	Activation of receptors in affecting synaptic networks and neuronal activity	Eusemann et al., 2015
A _{2B} R	Neurodegeneration	<i>In vivo</i>	ADO as a neuroprotector	Fusco et al., 2018
ADA	Neurodegeneration	<i>In vitro</i>	Decrease of ADA activity	Allen et al., 2019

ADA, adenosine deaminase; ADO, adenosine; AR, adenosine receptor; ATP, adenosine triphosphate; ENT1, equilibrative nucleoside transporter 1; LPS, lipopolysaccharide; Panx1, Pannexin 1; rENT1, rat equilibrative nucleoside transporter 1.

in neuronal disorders. ADO exerts a strong inhibitory or excitatory influence on neuronal synapses. Notably, neuronal-stem cell-derived astrocytes can develop into GB (Yao et al., 2018). Therefore, it is essential to understand the activation mechanisms of astrocytes and influence of ADO on their proliferation and function.

ADENOSINERGIC SIGNALING IN GLIOBLASTOMA MICROENVIRONMENT

Considering the lack of effective therapies for treating patients with GBs, new biological targets must be identified, and adenosinergic signaling has emerged as a candidate target (Azambuja et al., 2019a,b, 2020c,d,e; Yan et al., 2019). Studies by our group reported that CD73 overexpression in GB favors tumor progression (Azambuja et al., 2019b, 2020c,d). Moreover, A₁R sensitization potentiates *in vitro* GB cell proliferation, migration, and invasion and contributes to TMZ resistance (Azambuja et al., 2019a). The importance of this protein in cell adhesion and invasion has been verified, as it was observed that CD73 in GB interacts with the extracellular matrix of the TME (Cappellari et al., 2012b). Using an astrocytoma cell line (U373), A_{2B}R was described as a low-affinity receptor activated only by high concentrations of ADO, which occurs in pathological conditions such as hypoxia, and in contrast, A_{2A}R was expressed under physiological ADO levels in the brain (Eusemann et al., 2015). Studies of CD73-FLK mice detected positive regulation of A_{2B}R in GB, and its blockage potentiated TMZ-induced tumor cell death (Yan et al., 2019). A₁R and A_{2A}R are highly expressed in high-grade gliomas, specifically in grade III astrocytoma. In low-grade gliomas, A₁R and A_{2A}R exhibit low expression. ADO acts as a neuroprotective agent and prevents hypoxic toxicity, that is, deregulation of A₁R and A_{2A}R axis influences the metabolism of ADO in the invasive process of GB (Huang et al., 2016).

The tumor niche contains sites of hypoxia formed by the high rate of cell proliferation, without a corresponding increase in the rate of new blood vessel formation. This condition contributes to increased extracellular ATP levels, and consequently, selects the population of immunosuppressive cells present in the TME (Trabanelli et al., 2012). Interestingly, hypoxia conditions and the subsequent release of hypoxia-inducible factor-1 α have been associated with the accumulation of extracellular ADO in the TME via the CD39-CD73 axis and further signaling through A_{2A}R (Hatfield et al., 2014). Torres et al. (2019) reported that extracellular ADO production was higher in hypoxia conditions to promote cell migration and invasion in a hypoxia-inducible factor-2 dependent process, whereas A₃R blockade reversed this effect. This corroborated the findings of Niechi et al. (2019), who showed that ADO depletion decreases tumor aggressiveness. In addition, clinical trials of cancer immunotherapy targeting the “hypoxia-adenosinergic pathway” through hyperoxic breathing stimulation and A_{2A}R blockage in combination with conventional anti-PD1/PDL1 immunotherapy are underway (Ohta et al., 2006; Hatfield et al., 2015; Hatfield and Sitkovsky, 2020). These trials are reporting promising results in patients refractory to current therapies (Fong et al., 2020;

Willingham et al., 2020). However, it is important to highlight the lack of studies on the therapeutic effect in human CNS tumors.

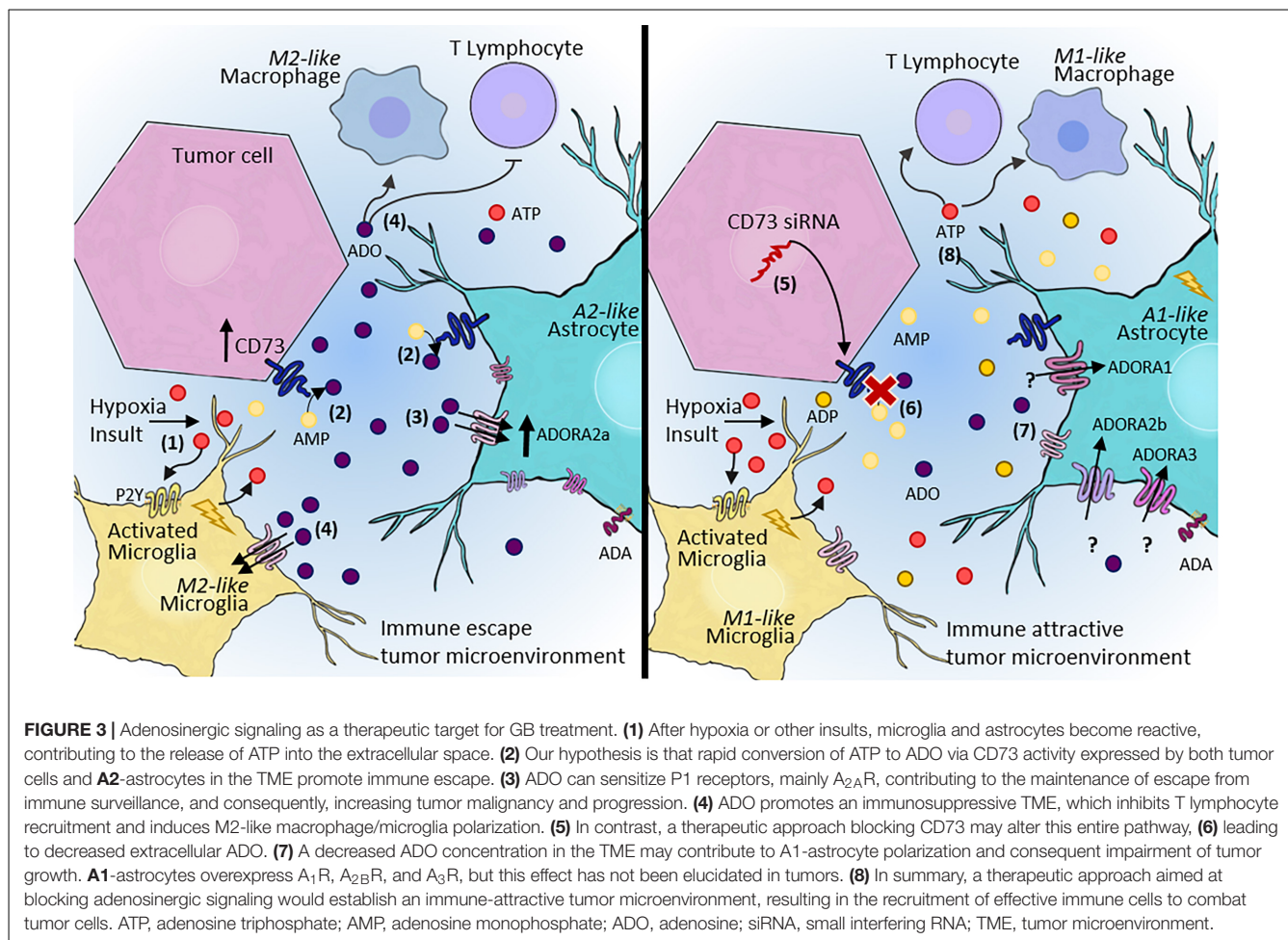
The release of EVs from tumor cells supports the ability of GBs to communicate with distant cells. Interestingly, the content of EVs reflects the activation state of the mother cell; hence, tumor cells can proliferate and modulate acceptor cells (Matarredona and Pastor, 2019; Zhang et al., 2019; Schuurmans et al., 2020). Studies of EVs are emerging and have shown promising results regarding their ability to maintain a propitious niche for tumor development, as they can modulate immune, epithelial, and glial cell signaling (Benito-Martin et al., 2015; Whiteside, 2017; Almeida et al., 2019; Boomgarden et al., 2020). Particularly, glioma cell lines as well as primary cultured cells released EVs capable of promoting M2-like activation of tumor-associated macrophages (Azambuja et al., 2020b). Moreover, exosomes, a subclassification of EVs, carry ADO and its products, such as inosine, hypoxanthine, and xanthine, which further contribute to independent adenosinergic signaling (Azambuja et al., 2020a; Ludwig et al., 2020).

Among the non-neoplastic cells comprising the TME, astrocytes stand out because of their high phenotypic similarity to GB cells (Galland et al., 2019). As mentioned earlier in this review, the astrocyte spectrum of activation of the A₂-like phenotype is associated with the success of GB progression. Astrocyte phenotypic modulation can be attributed to GB, further supporting the invasion and resistance to therapy (Oushy et al., 2018; Hallal et al., 2019). One of the main functions of ADO in the extracellular environment is to act as a potent immunosuppressive mediator, which benefits tumor progression (Linden, 2011; Tozaki-Saitoh et al., 2011; Allard et al., 2016; Arab and Hadjati, 2019).

Therefore, in agreement with the results of studies using other non-transformed cells comprising the TME, such as macrophages and microglia, the purinergic receptors and ectonucleotidases may be integral components affecting the phenotypic differentiation of tumor-associated astrocytes (Figure 2C). A better understanding of the crosstalk among microglia, astrocytes, and tumor cells may reveal innovative therapeutic options based mainly on adenosinergic signaling to overcome GB progression.

ADENOSINERGIC SIGNALING AS A THERAPEUTICAL STRATEGY FOR GLIOBLASTOMA

Considering the present review, it is possible to understand the importance of astrocytes in maintaining homeostasis in the brain and the effective participation of ATP and ADO signaling in several processes related to health and disease. As the main source of ADO in the CNS is extracellular ATP metabolism, regulation of the hydrolysis of AMP to ADO may play a crucial role in maintaining GB-associated immunosuppression and may be an additional alternative for GB treatment in combination with standard radio- and chemotherapy with TMZ. Indeed, studies have shown the potential of P1 receptor antagonism for anti-glioma therapy. For example, the A_{2B}R blockage would



contribute to recovering GB chemosensitivity to TMZ (Yan et al., 2019). In addition, the pharmacological blockade of CD73 using a selective inhibitor, the α,β -methylene adenosine 5'-diphosphate (APCP) have been described as a potential therapy for several tumors, such as melanoma, breast cancer, and gliomas (Koszalka et al., 2014; Tomczyk et al., 2018).

By using CD73 as a molecular target and nanotechnology as a strategy for siRNA delivery to the CNS, our group demonstrated the potential of CD73 inhibition and knockdown for controlling *in vitro* and *in vivo* tumor progression (Azambuja et al., 2019a). According to our studies, the pharmacological inhibition as well as the silencing of CD73 impaired the protumor activities of CD73, decreasing the tumor volume and providing an opportunity to overcome chemoresistance and/or improve the TMZ effect (Azambuja et al., 2019a, 2020c,d). We also recently reported the impact of blocking CD73 and consequent decrease in ADO availability on the levels of M2-like macrophages in the TME in a preclinical rat GB model (Azambuja et al., 2020e; Figure 3). These data strongly indicate the potential of using therapeutics to modulate the TME via purinergic constituents to re-establish the antitumor activity of immune cells. Nonetheless, the CD73 inhibition may not be always therapeutically helpful for tumors as seen for the GB and the specific biological

characteristics of each tumor should be considered. For example, in medulloblastoma, the CD73 expression is a marker associated with better prognosis of patients (Cappellari et al., 2012a, 2015).

Considering the similar features and responses of microglia and astrocytes in the TME, the ADO pathways may also be altered in astrocytic polarization, providing a therapeutic approach for treating patients with GB. Moreover, the participation of ADO and P1 receptors in the blood-brain barrier-associated properties is another interesting point for discussion about the therapeutical potential of ADO signaling blockage. As extensively described by Bynoe et al. (2015), both astrocyte's end-feet and endothelial cells of the blood-brain barrier express those receptors, especially A₁R and A_{2A}R. Therefore, P1R mediated-signaling is decisive to regulate the permeability of macromolecules, inflammatory cells, and even therapeutic drugs/cells into the CNS (Bynoe et al., 2015).

CONCLUDING REMARKS

The present review raises the hypothesis that reactive astrocytes are involved in the progression of brain tumors, such as GB. As astrocytes are instrumental to the microenvironment of the CNS,

they can be corrupted by tumor cells and directly and indirectly participate in the TME, thus regulating crosstalk among tumor, glial, and endothelial cells.

Notably, CD73 knockdown or inhibition decreases *in vitro* and *in vivo* GB growth, and CD73 is an interesting target for brain tumor therapy. Additionally, adenosinergic therapy can be applied in most TME cells to inactivate not only transformed cells but also tumor-associated cells, including A2-astrocytes that support tumor progression.

OPEN QUESTIONS

Considering the recent advances described in this review, although astrocyte participation in healthy and diseased brain biology has been well-established, there is no general agreement on astrocytic polarization in different phenotypes according to the nature of the injury, nor specifically in brain tumors. Recently, astrocytes were proposed to be involved in neuroinflammation. Further studies are needed to better describe their full characteristics and key features in different disorders involving immune components. Moreover, studies of astrocytic polarization are necessary to understand if different injury conditions lead to the production of different subpopulations of A1/neurotoxic and A2/neuroprotective astrocytes, or to transition stages until the fully reactivated cell state is reached.

Few studies have focused on the link between purinergic signaling and astrocyte participation in the tumor niche constitution. Considering the key role of the gliotransmitter ATP and its metabolite ADO on astrocyte functions, the specific factors involved in purinergic signaling, particularly adenosinergic signaling, as potential makers of astrocyte polarization should be further examined. Additionally, the contribution of ADO as a potent modulator of immune responses may directly influence astrocytic polarization, which requires further analysis. Moreover, the contribution of

astrocyte-microglia crosstalk may be another key element in the outcome of GB, as well as for other CNS pathologies.

Finally, considering the genetic and phenotypic similarities of astrocytes and GB cells, tracing possible molecular markers or determining the signature of different astrocytic phenotypes is a crucial strategy for determining the contribution of non-malignant astrocytes in brain tumor physiology and establishing more effective therapeutic approaches.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GD and DR selected articles in PubMed and analyzed articles. GD created **Table 1**. DR assembled the figures. EB acquired the funding, supervised, and guided the entire work. All authors conceived the idea of studying the role of purinergic signaling in astrocytes and tumor progression, wrote and edited the article, and reviewed and edited the final text.

FUNDING

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; process number 19/2551-0001779-0; PRONEX – 16/2551-0000473-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; code 001), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq process number 312187/2018-1; 400882/2019-1). GD, DR, and EB are recipients of CAPES or CNPq fellowships.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. B. Haas, J. A. M. Barbuto, and A. A. Rasia Filho for providing expert advice and suggestions on the manuscript.

REFERENCES

- Adzic, M., and Nedeljkovic, N. (2018). Unveiling the role of Ecto-5'-nucleotidase/CD73 in astrocyte migration by using pharmacological tools. *Front. Pharmacol.* 9:153. doi: 10.3389/fphar.2018.00153
- Adzic, M., Stevanovic, I., Josipovic, N., Laketa, D., Lavrnja, I., Bjelobaba, I. M., et al. (2017). Extracellular ATP induces graded reactive response of astrocytes and strengthens their antioxidative defense in vitro. *J. Neurosci. Res.* 95, 1053–1066. doi: 10.1002/jnr.23950
- Agostinho, P., Madeira, D., Dias, L., Simões, A. P., Cunha, R. A., and Canas, P. M. (2020). Purinergic signaling orchestrating neuron-glia communication. *Pharmacol. Res.* 162:105253. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105253
- Allard, B., Allard, D., Buisseret, L., and Stagg, J. (2020). The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17, 611–629. doi: 10.1038/s41571-020-0382-2
- Allard, B., Beavis, P. A., Darcy, P. K., and Stagg, J. (2016). Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 29, 7–16. doi: 10.1016/j.coph.2016.04.001
- Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., and Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.* 276, 121–144. doi: 10.1111/imr.12528
- Allen, S. P., Hall, B., Castelli, L. M., Francis, L., Woof, R., Siskos, A. P., et al. (2019). Astrocyte adenosine deaminase loss increases motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 142, 586–605. doi: 10.1093/brain/awz353
- Almeida, V. H., Rondon, A. M. R., Gomes, T., and Monteiro, R. Q. (2019). Novel Aspects of Extracellular Vesicles as Mediators of Cancer-Associated Thrombosis. *Cells* 8:716. doi: 10.3390/cells8070716
- Arab, S., and Hadjati, J. (2019). Adenosine blockage in tumor microenvironment and improvement of cancer immunotherapy. *Immune Netw.* 19, 1–19. doi: 10.4110/in.2019.19.e23
- Azambuja, J. H., Gelsleichter, N. E., Beckenkamp, L. R., Iser, I. C., Fernandes, M. C., Figueiró, F., et al. (2019a). CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. *Mol. Neurobiol.* 56, 3260–3279. doi: 10.1007/s12035-018-1240-4
- Azambuja, J. H., Ludwig, N., Braganhol, E., and Whiteside, T. L. (2019b). Inhibition of the adenosinergic pathway in cancer rejuvenates innate and adaptive immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 20:5698. doi: 10.3390/ijms20225698
- Azambuja, J. H., Ludwig, N., Yerneni, S. S., Braganhol, E., and Whiteside, T. L. (2020b). Arginase-1+ exosomes from reprogrammed macrophages promote glioblastoma progression. *Int. J. Mol. Sci.* 21:3990. doi: 10.3390/ijms21113990
- Azambuja, J. H., Ludwig, N., Yerneni, S., Rao, A., Braganhol, E., and Whiteside, T. L. (2020a). Molecular profiles and immunomodulatory activities of glioblastoma-derived exosomes. *Neurooncol. Adv.* 2, 1–11. doi: 10.1093/oaajnl/vdaa056

- Azambuja, J. H., Schuh, R. S., Michels, L. R., Gelsleichter, N. E., Beckenkamp, L. R., Iser, I. C., et al. (2020c). Nasal Administration of Cationic Nanoemulsions as CD73-siRNA Delivery System for Glioblastoma Treatment: a New Therapeutical Approach. *Mol. Neurobiol.* 57, 635–649. doi: 10.1007/s12035-019-01730-6
- Azambuja, J. H., Schuh, R. S., Michels, L. R., Iser, I. C., Beckenkamp, L. R., Roliano, G. G., et al. (2020e). Blockade of CD73 delays glioblastoma growth by modulating the immune environment. *Cancer Immunol. Immunother.* 69, 1801–1812. doi: 10.1007/s00262-020-02569-w
- Azambuja, J. H., Schuh, R. S., Michels, L. R., Gelsleichter, N. E., Beckenkamp, L. R., Lenz, G. S., et al. (2020d). CD73 as a target to improve temozolomide chemotherapy effect in glioblastoma preclinical model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 85, 1177–1182. doi: 10.1007/s00280-020-04077-1
- Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16, 1–13. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.016
- Basanta, D., and Anderson, A. R. A. (2017). Homeostasis back and forth: an ecoevolutionary perspective of cancer. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 7, 1–19. doi: 10.1101/cshperspect.a028332
- Benito-Martin, A., Di Giannatale, A., Ceder, S., and Peinado, H. (2015). The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression. *Front. Immunol.* 6:66. doi: 10.3389/fimmu.2015.00066
- Bocazzi, M., and Ceruti, S. (2016). Where do you come from and what are you going to become, reactive astrocyte? *Stem Cell Investig.* 3, 15–15. doi: 10.21037/sci.2016.05.02
- Boomgarden, A. C., Sheehan, C., and D'Souza-Schorey, C. (2020). Extracellular Vesicles in the Tumor Microenvironment: various Implications in Tumor Progression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1259, 155–170. doi: 10.1007/978-3-030-43093-1_9
- Boswell-Casteel, R. C., and Hays, F. A. (2017). Equilibrative nucleoside transporters—A review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 36, 7–30. doi: 10.1080/15257770.2016.1210805
- Brandao, M., Simon, T., Critchley, G., and Giamas, G. (2019). Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment. *Glia* 67, 779–790. doi: 10.1002/glia.23520
- Broekman, M. L., Maas, S. L. N., Abels, E. R., Mempel, T. R., Krichevsky, A. M., and Breakefield, X. O. (2018). Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 1–14. doi: 10.1038/s41582-018-0025-8
- Burda, J. E., Bernstein, A. M., and Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 275, 305–315. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.03.020
- Burnstock, G. (2007). Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659–797. doi: 10.1152/physrev.00043.2006
- Bynoe, M. S., Viret, C., Yan, A., and Kim, D.-G. (2015). Adenosine receptor signalling: a key to opening the blood-brain door. *Fluids Barr. CNS* 12:20. doi: 10.1186/s12987-015-0017-7
- Campos-Contreras, A. D. R., Díaz-Muñoz, M., and Vázquez-Cuevas, F. G. (2020). Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. *Cells* 9, 1–24. doi: 10.3390/cells9071612
- Cappellari, A. R., Pillat, M. M., Souza, H. D. N., Dietrich, F., Oliveira, F. H., Figueiró, F., et al. (2015). Ecto-5'-Nucleotidase Overexpression Reduces Tumor Growth in a Xenograph Medulloblastoma Model. *PLoS One* 10:e0140996. doi: 10.1371/journal.pone.0140996
- Cappellari, A. R., Rockenbach, L., Dietrich, F., Clarimundo, V., Glaser, T., Braganhol, E., et al. (2012a). Characterization of Ectonucleotidases in Human Medulloblastoma Cell Lines: ecto-5'NT/CD73 in Metastasis as Potential Prognostic Factor. *PLoS One* 7:e47468. doi: 10.1371/journal.pone.0047468
- Cappellari, A. R., Vasques, G. J., Bavaresco, L., Braganhol, E., and Battastini, A. M. O. (2012b). Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion. *Mol. Cell. Biochem.* 359, 315–322. doi: 10.1007/s11010-011-1025-9
- Carter, S. F., Herholz, K., Rosa-Neto, P., Pellerin, L., Nordberg, A., and Zimmer, E. R. (2019). Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends Mol. Med.* 25, 77–95. doi: 10.1016/j.molmed.2018.11.006
- Cerri, S., Levandis, G., Ambrosi, G., Montepeloso, E., Antoninetti, G. F., Franco, R., et al. (2014). Neuroprotective potential of adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptor antagonists in an animal model of Parkinson disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 414–424. doi: 10.1097/NEN.0000000000000064
- Cervetto, C., Venturini, A., Guidolin, D., Maura, G., Passalacqua, M., Tacchetti, C., et al. (2018). Homocysteine and A2A-D2 receptor-receptor interaction at striatal astrocyte processes. *J. Mol. Neurosci.* 65, 456–466. doi: 10.1007/s12031-018-1120-4
- Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R., and Kettenmann, H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia* 59, 1169–1180. doi: 10.1002/glia.21136
- Chen, W., Wang, D., Du, X., He, Y., Chen, S., Shao, Q., et al. (2015). Glioma cells escaped from cytotoxicity of temozolomide and vincristine by communicating with human astrocytes. *Med. Oncol.* 32:43. doi: 10.1007/s12032-015-0487-0
- Chen, Z., and Hambardzumyan, D. (2018). Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front. Immunol.* 9:1004. doi: 10.3389/fimmu.2018.01004
- Clarke, L. E., and Barres, B. A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 311–321. doi: 10.1038/nrn3484
- Clarke, L. E., Liddelow, S. A., Chakraborty, C., Münch, A. E., Heiman, M., and Barres, B. A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E1896–E1905. doi: 10.1073/pnas.1800165115
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., et al. (2003). Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture. *J. Biol. Chem.* 278, 1354–1362. doi: 10.1074/jbc.M209454200
- Covelo, A., and Araque, A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *Elife* 7, 1–19. doi: 10.7554/eLife.32237
- Cunha, R. A. (2016). How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *J. Neurochem.* 139, 1019–1055. doi: 10.1111/jnc.13724
- Da Fonseca, A. C. C., Amaral, R., Garcia, C., Geraldo, L. H., Matias, D., and Lima, F. R. S. (2016). Microglia in cancer: for good or for bad? *Adv. Exp. Med. Biol.* 949, 245–261. doi: 10.1007/978-3-319-40764-7_12
- Di Carlo, D. T., Cagnazzo, F., Benedetto, N., Morganti, R., and Perrini, P. (2019). Multiple high-grade gliomas: epidemiology, management, and outcome. *Syst. Rev. Metaanal. Neurosurg. Rev.* 42, 263–275. doi: 10.1007/s10143-017-0928-7
- Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P., and Abbracchio, M. P. (2009). Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci.* 32, 79–87. doi: 10.1016/j.tins.2008.11.003
- Di Virgilio, F., Falzoni, S., Giuliani, A. L., and Adinolfi, E. (2016). P2 receptors in cancer progression and metastatic spreading. *Curr. Opin. Pharmacol.* 29, 17–25. doi: 10.1016/j.coph.2016.05.001
- Di Virgilio, F., Sarti, A. C., Falzoni, S., De Marchi, E., and Adinolfi, E. (2018). Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 18, 601–618. doi: 10.1038/s41568-018-0037-0
- Díaz-Castro, B., Gangwani, M. R., Yu, X., Coppola, G., and Khakh, B. S. (2019). Astrocyte molecular signatures in Huntington's disease. *Sci. Transl. Med.* 11:eaw8546. doi: 10.1126/scitranslmed.aaw8546
- Dunwiddie, T. V. (1985). The Physiological Role of Adenosine In The Central Nervous System. *Int. Rev. Neurobiol.* 27, 63–139. doi: 10.1016/S0074-7742(08)60556-5
- Escartin, C., Guillemaud, O., and Carrillo-de Sauvage, M. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia* 67, 2221–2247. doi: 10.1002/glia.23687
- Eusemann, T. N., Willmroth, F., Fiebich, B., Biber, K., and Van Calter, D. (2015). Adenosine receptors differentially regulate the expression of regulators of G-protein signalling (RGS) 2, 3 and 4 in astrocyte-like cells. *PLoS One* 10:e0134934. doi: 10.1371/journal.pone.0134934
- Ferreira-Silva, J., Aires, I. D., Boia, R., Ambrósio, A. F., and Santiago, A. R. (2020). Activation of Adenosine A3 Receptor Inhibits Microglia Reactivity Elicited by Elevated Pressure. *Int. J. Mol. Sci.* 21:7218. doi: 10.3390/ijms21197218
- Ficker, C., Rozmer, K., Kató, E., Andó, R. D., Schumann, L., Krügel, U., et al. (2014). Astrocyte-neuron interaction in the substantia gelatinosa of the spinal cord dorsal horn via P2X7 receptor-mediated release of glutamate and reactive oxygen species. *Glia* 62, 1671–1686. doi: 10.1002/glia.22707
- Florian, C., Vecsey, C. G., Halassa, M. M., Haydon, P. G., and Abel, T. (2011). Astrocyte-derived adenosine and A1 receptor activity contribute to sleep loss-induced deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory in mice. *J. Neurosci.* 31, 6956–6962. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5761-10.2011

- Fong, L., Hotson, A., Powderly, J. D., Sznol, M., Heist, R. S., Choueiri, T. K., et al. (2020). Adenosine 2A receptor blockade as an immunotherapy for treatment-refractory renal cell cancer. *Cancer Discov.* 10, 40–53. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0980
- Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., and Müller, C. E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol. Rev.* 63, 1–34. doi: 10.1124/pr.110.003285
- Fusco, I., Ugolini, F., Lana, D., Coppi, E., Dettori, I., Gaviano, L., et al. (2018). The selective antagonism of adenosine A2B receptors reduces the synaptic failure and neuronal death induced by oxygen and glucose deprivation in rat CA1 hippocampus in vitro. *Front. Pharmacol.* 9:399. doi: 10.3389/fphar.2018.00399
- Galland, F., Seady, M., Taday, J., Smaili, S. S., Gonçalves, C. A., and Leite, M. C. (2019). Astrocyte culture models: molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochem. Int.* 131:104538. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104538
- Giering, A., Pszczolkowska, D., Walentynowicz, K. A., Rajan, W. D., and Kaminska, B. (2017). Immune microenvironment of gliomas. *Laborat. Investig.* 97, 498–518. doi: 10.1038/labinvest.2017.19
- Goetzl, E. J., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Jicha, G. A., and Kapogiannis, D. (2018). High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 83, 544–552. doi: 10.1002/ana.25172
- Grimaldi, A., Pediconi, N., Oieni, F., Pizzarelli, R., Rosito, M., Giubertini, M., et al. (2019). Neuroinflammatory Processes, A1 Astrocyte Activation and Protein Aggregation in the Retina of Alzheimer's Disease Patients, Possible Biomarkers for Early Diagnosis. *Front. Neurosci.* 13:925. doi: 10.3389/fnins.2019.00925
- Guan, X., Hasan, M. N., Maniar, S., Jia, W., and Sun, D. (2018). Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme. *Mol. Neurobiol.* 55, 6927–6938. doi: 10.1007/s12035-018-0880-8
- Guthrie, P. B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M. V. L., Charles, A. C., and Kater, S. B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci.* 19, 520–528. doi: 10.1523/jneurosci.19-02-00520.1999
- Hajrasouliha, A. R., Jiang, G., Lu, Q., Lu, H., Kaplan, H. J., Zhang, H.-G., et al. (2013). Exosomes from Retinal Astrocytes Contain Antiangiogenic Components That Inhibit Laser-induced Choroidal Neovascularization. *J. Biol. Chem.* 288, 28058–28067. doi: 10.1074/jbc.M113.470765
- Hallal, S., Mallawaarachy, D. M., Wei, H., Ebrahimkhani, S., Stringer, B. W., Day, B. W., et al. (2019). Extracellular Vesicles Released by Glioblastoma Cells Stimulate Normal Astrocytes to Acquire a Tumor-Supportive Phenotype Via p53 and MYC Signaling Pathways. *Mol. Neurobiol.* 56, 4566–4581. doi: 10.1007/s12035-018-1385-1
- Hambardzumyan, D., Gutmann, D. H., and Kettenmann, H. (2016). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat. Neurosci.* 19, 20–27. doi: 10.1038/nn.4185
- Hammarberg, C., Schulte, G., and Fredholm, B. B. (2003). Evidence for functional adenosine A3 receptors in microglia cells. *J. Neurochem.* 86, 1051–1054. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01919.x
- Haskó, G., Pacher, P., Sylvester Vizi, E., and Illes, P. (2005). Adenosine receptor signaling in the brain immune system. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 511–516. doi: 10.1016/j.tips.2005.08.004
- Hatfield, S. M., and Sitkovsky, M. V. (2020). Antihypoxic oxygenation agents with respiratory hyperoxia to improve cancer immunotherapy. *J. Clin. Investig.* 130, 5629–5637. doi: 10.1172/JCI137554
- Hatfield, S. M., Kjaergaard, J., Lukashev, D., Belikoff, B., Schreiber, T. H., Sethumadhavan, S., et al. (2014). Systemic oxygenation weakens the hypoxia and hypoxia inducible factor 1 α -dependent and extracellular adenosine-mediated tumor protection. *J. Mol. Med.* 92, 1283–1292. doi: 10.1007/s00109-014-1189-3
- Hatfield, S. M., Kjaergaard, J., Lukashev, D., Schreiber, T. H., Belikoff, B., Abbott, R., et al. (2015). Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci. Transl. Med.* 7, 277ra30. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa1260
- Henrik Heiland, D., Ravi, V. M., Behringer, S. P., Frenking, J. H., Wurm, J., Joseph, K., et al. (2019). Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat. Commun.* 10:2541. doi: 10.1038/s41467-019-10493-6
- Hinkle, J. T., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2019). The A1 astrocyte paradigm: new avenues for pharmacological intervention in neurodegeneration. *Movement Disord.* 34, 959–969. doi: 10.1002/mds.27718
- Hinton, D. J., Lee, M. R., Jang, J. S., and Choi, D. S. (2014). Type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein expression in the striatum. *Brain Behav.* 4, 903–914. doi: 10.1002/brb3.283
- Huang, J., Chen, M. N., Du, J., Liu, H., He, Y. J., Li, G. L., et al. (2016). Differential Expression of Adenosine P1 Receptor ADORA1 and ADORA2A Associated with Glioma Development and Tumor-Associated Epilepsy. *Neurochem. Res.* 41, 1774–1783. doi: 10.1007/s11064-016-1893-1
- Huse, J. T., and Holland, E. C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat. Rev. Cancer* 10, 319–331. doi: 10.1038/nrc2818
- Illes, P. (2020). P2X7 Receptors Amplify CNS Damage in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 21:5996. doi: 10.3390/ijms21175996
- Illes, P., Burnstock, G., and Tang, Y. (2019). Astroglia-Derived ATP Modulates CNS Neuronal Circuits. *Trends Neurosci.* 42, 885–898. doi: 10.1016/j.tins.2019.09.006
- Jha, M. K., Jo, M., Kim, J. H., and Suk, K. (2019). Microglia-Astrocyte Crosstalk: an Intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist* 25, 227–240. doi: 10.1177/1073858418783959
- Joyce, J. A., and Fearon, D. T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 348, 74–80. doi: 10.1126/science.aaa6204
- Khakh, B. S., and Burnstock, G. (2009). The Double Life of ATP. *Sci. Am.* 301, 84–92. doi: 10.1038/scientificamerican1209-84
- Khakh, B. S., and Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits Introduction and historical perspective. *Nat. Neurosci.* 18, 942–952. doi: 10.1038/nn.4043.Diversity
- Kong, Y., Peng, Q., Lv, N., Yuan, J., Deng, Z., Liang, X., et al. (2020). Paeoniflorin exerts neuroprotective effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via activation of adenosine A1 receptor. *Neurosci. Lett.* 730:135016. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135016
- Koszalka, P., Pryszałak, A., Gołuńska, M., Kolasa, J., Stasiłojć, G., Składanowski, A. C., et al. (2014). Inhibition of CD73 stimulates the migration and invasion of B16F10 melanoma cells in vitro, but results in impaired angiogenesis and reduced melanoma growth in vivo. *Oncol. Rep.* 31, 819–827. doi: 10.3892/or.2013.2883
- Lavrnia, I., Laketa, D., Savic, D., Bozic, I., Bjelobaba, I., Pekovic, S., et al. (2015). Expression of a Second Ecto-5'-Nucleotidase Variant Besides the Usual Protein in Symptomatic Phase of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Mol. Neurosci.* 55, 898–911. doi: 10.1007/s12031-014-0445-x
- Le, D. M., Besson, A., Fogg, D. K., Choi, K. S., Waisman, D. M., Goodyer, C. G., et al. (2003). Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade. *J. Neurosci.* 23, 4034–4043. doi: 10.1523/jneurosci.23-10-04034.2003
- Leiss, L., Mega, A., Olsson Bontell, T., Nistér, M., Smits, A., Corvigno, S., et al. (2020). Platelet-derived growth factor receptor α /glial fibrillary acidic protein expressing peritumoral astrocytes associate with shorter median overall survival in glioblastoma patients. *Glia* 68, 979–988. doi: 10.1002/glia.23756
- Liddel, S. A., and Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: production. *Funct. Therapeut. Potent. Immunity* 46, 957–967. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.006
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487. doi: 10.1038/nature21029
- Linden, J. (2011). Regulation of Leukocyte Function by Adenosine Receptors. *Adv. Pharmacol.* 61, 95–114. doi: 10.1016/B978-0-12-385526-8.00004-7
- Lopes, C. R., Cunha, R. A., and Agostinho, P. (2021). Astrocytes and Adenosine A2A Receptors: active Players in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 15:666710. doi: 10.3389/fnins.2021.666710
- Ludwig, N., Jackson, E. K., and Whiteside, T. L. (2020). Role of exosome-associated adenosine in promoting angiogenesis. *Vessel Plus* 2020, 37–40. doi: 10.20517/2574-1209.2019.37
- Ma, Z., Stork, T., Bergles, D. E., and Freeman, M. R. (2016). Neuromodulators signal through astrocytes to alter neural circuit activity and behaviour. *Nature* 539, 428–432. doi: 10.1038/nature20145
- Marcelino, H., Nogueira, V. C., Santos, C. R. A., Quelhas, P., Carvalho, T. M. A., Fonseca-Gomes, J., et al. (2020). Adenosine inhibits human astrocyte

- proliferation independently of adenosine receptor activation. *J. Neurochem.* 153, 455–467. doi: 10.1111/jnc.14937
- Martin-Fernandez, M., Jamison, S., Robin, L. M., Zhao, Z., Martin, E. D., Aguilar, J., et al. (2017). Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior. *Nat. Neurosci.* 20, 1540–1548. doi: 10.1038/nn.4649
- Matarredona, E. R., and Pastor, A. M. (2019). Extracellular Vesicle-Mediated Communication between the Glioblastoma and Its Microenvironment. *Cells* 9:96. doi: 10.3390/cells9010096
- Matias, D., Predes, D., Niemeyer Filho, P., Lopes, M. C., Abreu, J. G., Lima, F. R. S., et al. (2017). Microglia-glioblastoma interactions: new role for Wnt signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1868, 333–340. doi: 10.1016/j.bbcan.2017.05.007
- Matos, M., Augusto, E., Agostinho, P., Cunha, R. A., and Chen, J.-F. (2013). Antagonistic Interaction between Adenosine A2A Receptors and Na⁺/K⁺-ATPase-2 Controlling Glutamate Uptake in Astrocytes. *J. Neurosci.* 33, 18492–18502. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1828-13.2013
- Matos, M., Shen, H., Augusto, E., Wang, Y., Wei, C. J., Wang, Y. T., et al. (2015). Deletion of Adenosine A2A Receptors From Astrocytes Disrupts Glutamate Homeostasis Leading to Psychomotor and Cognitive Impairment: relevance to Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 78, 763–774. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.02.026
- Mederos, S., Hernández-Vivanco, A., Ramírez-Franco, J., Martín-Fernández, M., Navarrete, M., Yang, A., et al. (2019). Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks. *Glia* 67, 915–934. doi: 10.1002/glia.23580
- Mega, A., Hartmark Nilsen, M., Leiss, L. W., Tobin, N. P., Miletic, H., Sleire, L., et al. (2020). Astrocytes enhance glioblastoma growth. *Glia* 68, 316–327. doi: 10.1002/glia.23718
- Minkiewicz, J., de Rivero Vaccari, J. P., and Keane, R. W. (2013). Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* 61, 1113–1121. doi: 10.1002/glia.22499
- Moidunny, S., Vinet, J., Wesseling, E., Bijzet, J., Shieh, C. H., van Ijzendoorn, S. C. D., et al. (2012). Adenosine A2B receptor-mediated leukemia inhibitory factor release from astrocytes protects cortical neurons against excitotoxicity. *J. Neuroinflamm.* 9, 1–18. doi: 10.1186/1742-2094-9-198
- Nadjar, A., Blumstein, T., Aubert, A., Laye, S., and Haydon, P. G. (2013). Astrocyte-derived adenosine modulates increased sleep pressure during inflammatory response. *Glia* 61, 724–731. doi: 10.1002/glia.22465
- Najafi, M., Goradel, N. H., Farhood, B., Salehi, E., Solhjoo, S., Toolee, H., et al. (2019). Tumor microenvironment: interactions and therapy. *J. Cell. Physiol.* 234, 5700–5721. doi: 10.1002/jcp.27425
- Niechi, I., Uribe-Ojeda, A., Erices, J. I., Torres, Á., Uribe, D., Rocha, J. D., et al. (2019). Adenosine Depletion as A New Strategy to Decrease Glioblastoma Stem-Like Cells Aggressiveness. *Cells* 8, 1–15. doi: 10.3390/cells8111353
- Norøxe, D. S., Poulsen, H. S., and Lassen, U. (2016). Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open* 1, 1–9. doi: 10.1136/esmoopen-2016-001044
- Ogawa, Y., Furusawa, E., Saitoh, T., Sugimoto, H., Omori, T., Shimizu, S., et al. (2018). Inhibition of astrocytic adenosine receptor A2A attenuates microglial activation in a mouse model of Sandhoff disease. *Neurobiol. Dis.* 118, 142–154. doi: 10.1016/j.nbd.2018.07.014
- Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S. J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M. K. K., et al. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13132–13137. doi: 10.1073/pnas.0605251103
- Okada, M., Fukuyama, K., Shiroyama, T., and Ueda, Y. (2019). Carbamazepine attenuates astroglial l-glutamate release induced by pro-inflammatory cytokines via chronically activation of adenosine A2A receptor. *Int. J. Mol. Sci.* 20:3727. doi: 10.3390/ijms20153727
- Oushy, S., Hellwinkel, J. E., Wang, M., Nguyen, G. J., Gunaydin, D., Harland, T. A., et al. (2018). Glioblastoma multiforme-derived extracellular vesicles drive normal astrocytes towards a tumour-enhancing phenotype. *Philos. Transac. R. Soc. B Biol. Sci.* 373:20160477. doi: 10.1098/rstb.2016.0477
- Paiva, I., Carvalho, K., Santos, P., Cellai, L., Pavlou, M. A. S., Jain, G., et al. (2019). A2AR-induced transcriptional deregulation in astrocytes: an in vitro study. *Glia* 67, 2329–2342. doi: 10.1002/glia.23688
- Pangrsić, T., Potokar, M., Stenovec, M., Kreft, M., Fabbretti, E., Nistri, A., et al. (2007). Exocytotic Release of ATP from Cultured Astrocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 28749–28758. doi: 10.1074/jbc.M700290200
- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., and Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E197–E205. doi: 10.1073/pnas.1111098109
- Pasqualini, C., Kozaki, T., Bruschi, M., Nguyen, T. H. H., Minard-Colin, V., Castel, D., et al. (2020). Modeling the Interaction between the Microenvironment and Tumor Cells in Brain Tumors. *Neuron* 108, 1025–1044. doi: 10.1016/j.neuron.2020.09.018
- Pastor-Anglada, M., and Pérez-Torras, S. (2018). Who Is Who in Adenosine Transport. *Front. Pharmacol.* 9:627. doi: 10.3389/fphar.2018.00627
- Pavlou, M. A. S., Grandbarbe, L., Buckley, N. J., Niclou, S. P., and Michelucci, A. (2019). Transcriptional and epigenetic mechanisms underlying astrocyte identity. *Progress Neurobiol.* 174, 36–52. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.12.007
- Pekny, M., and Pekna, M. (2014). Astrocyte Reactivity and Reactive Astrogliosis: costs and Benefits. *Physiol. Rev.* 94, 1077–1098. doi: 10.1152/physrev.00041.2013
- Placone, A. L., Quiñones-Hinojosa, A., and Searson, P. C. (2016). The role of astrocytes in the progression of brain cancer: complicating the picture of the tumor microenvironment. *Tumor Biol.* 37, 61–69. doi: 10.1007/s13277-015-4242-0
- Proia, P., Schiera, G., Mineo, M., Ingrassia, A., Santoro, G., Savettieri, G., et al. (2008). Astrocytes shed extracellular vesicles that contain fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor. *Int. J. Mol. Med.* 21, 63–67. doi: 10.3892/ijmm.21.1.63
- Quail, D. F., and Joyce, J. A. (2017). The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* 31, 326–341. doi: 10.1016/j.ccell.2017.02.009
- Rajendran, L., Bali, J., Barr, M. M., Court, F. A., Kramer-Albers, E.-M., Picou, F., et al. (2014). Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the Nervous System. *J. Neurosci.* 34, 15482–15489. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3258-14.2014
- Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R. A., and Mulle, C. (2008). Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron* 57, 121–134. doi: 10.1016/j.neuron.2007.11.023
- Redzic, Z. B., Malatiali, S. A., Al-Bader, M., and Al-Sarraf, H. (2010). Effects of hypoxia, glucose deprivation and recovery on the expression of nucleoside transporters and adenosine uptake in primary culture of rat cortical astrocytes. *Neurochem. Res.* 35, 1434–1444. doi: 10.1007/s11064-010-0203-6
- Rodrigues, R. J., Tomé, A. R., and Cunha, R. A. (2015). ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Front. Neurosci.* 9:148. doi: 10.3389/fnins.2015.00148
- Roesch, S., Rapp, C., Dettling, S., and Herold-Mende, C. (2018). When immune cells turn bad—tumor-associated microglia/macrophages in glioma. *Int. J. Mol. Sci.* 19:436. doi: 10.3390/ijms19020436
- Scemes, E., Velišek, L., and Velišková, J. (2019). Astrocyte and Neuronal Pannexin1 Contribute Distinctly to Seizures. *ASN Neuro* 11:1759091419833502. doi: 10.1177/1759091419833502
- Schalla, M. A., and Stengel, A. (2019). Pharmacological Modulation of Ghrelin to Induce Weight Loss: successes and Challenges. *Curr. Diab. Rep.* 19:102. doi: 10.1007/s11892-019-1211-9
- Scharbarg, E., Daenens, M., Lemaître, F., Geoffroy, H., Guille-Collignon, M., Gallopin, T., et al. (2016). Astrocyte-derived adenosine is central to the hypnogenic effect of glucose. *Sci. Rep.* 6, 1–14. doi: 10.1038/srep19107
- Schmitt, L. I., Sims, R. E., Dale, N., and Haydon, P. G. (2012). Wakefulness affects synaptic and network activity by increasing extracellular astrocyte-derived adenosine. *J. Neurosci.* 32, 4417–4425. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5689-11.2012
- Schuermans, C., Balakrishnan, A., Roy, S., Fleming, T., and Leong, H. S. (2020). The emerging role of extracellular vesicles in the glioma microenvironment: biogenesis and clinical relevance. *Cancers* 12, 1–25. doi: 10.3390/cancers12071964
- Singh, A. V., Raymond, M., Pace, F., Certo, A., Zuidema, J. M., McKay, C. A., et al. (2015). Astrocytes increase ATP exocytosis mediated calcium signaling in response to microgroove structures. *Sci. Rep.* 5, 1–8. doi: 10.1038/srep07847
- Singh, M., Garrison, J. E., Wang, K., and Sheffield, V. C. (2019). Absence of BBSome function leads to astrocyte reactivity in the brain. *Mol. Brain* 12, 1–19. doi: 10.1186/s13041-019-0466-z
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647. doi: 10.1016/j.tins.2009.08.002
- Sofroniew, M. V., and Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8

- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C. G., and Charles, A. C. (2002). Intercellular Calcium Signaling in Astrocytes via ATP Release through Connexin Hemichannels. *J. Biol. Chem.* 277, 10482–10488. doi: 10.1074/jbc.M109902200
- Streptos, D., Markouli, M., Klonou, A., Piperi, C., and Papavassiliou, A. G. (2020). Insights in the immunobiology of glioblastoma. *J. Mol. Med.* 98, 1–10. doi: 10.1007/s00109-019-01835-4
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., et al. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New Engl. J. Med.* 352, 987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
- Suadani, S. O., Iglesias, R., Wang, J., Dahl, G., Spray, D. C., and Scemes, E. (2012). ATP signaling is deficient in cultured pannexin1-null mouse astrocytes. *Glia* 60, 1106–1116. doi: 10.1002/glia.22338
- Synowitz, M., Glass, R., Färber, K., Markovic, D., Kronenberg, G., Herrmann, K., et al. (2006). A1 Adenosine Receptors in Microglia Control Glioblastoma-Host Interaction. *Cancer Res.* 66, 8550–8557. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0365
- Tirosh, I., and Süvå, M. L. (2018). Dissecting human gliomas by single-cell RNA sequencing. *Neurooncology* 20, 37–43. doi: 10.1093/neuonc/nox126
- Tomczyk, M., Mierzejewska, P., Slominska, E. M., and Smolenski, R. T. (2018). The metabolism of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibitor- α , β -methylene adenosine diphosphate in BALB/c mice. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 37, 709–716. doi: 10.1080/15257770.2018.1489052
- Torres, Á., Erices, J. I., Sanchez, F., Ehrenfeld, P., Turchi, L., Virolle, T., et al. (2019). Extracellular adenosine promotes cell migration/invasion of Glioblastoma Stem-like Cells through A3 Adenosine Receptor activation under hypoxia. *Cancer Lett.* 446, 112–122. doi: 10.1016/j.canlet.2019.01.004
- Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M., and Inoue, K. (2011). Role of Purinergic Receptors in CNS Function and Neuroprotection. *Adv. Pharmacol.* 61, 495–528. doi: 10.1016/B978-0-12-385526-8.00015-1
- Trabanelli, S., Oeðliková, D., Gulinelli, S., Curti, A., Salvestrini, V., de Paula Vieira, R., et al. (2012). Extracellular ATP Exerts Opposite Effects on Activated and Regulatory CD4 + T Cells via Purinergic P2 Receptor Activation. *J. Immunol.* 189, 1303–1310. doi: 10.4049/jimmunol.1103800
- Verano-Braga, T., Gorshkov, V., Munthe, S., Sørensen, M. D., Kristensen, B. W., and Kjeldsen, F. (2018). SuperQuant-assisted comparative proteome analysis of glioblastoma subpopulations allows for identification of potential novel therapeutic targets and cell markers. *Oncotarget* 9, 9400–9414. doi: 10.18632/oncotarget.24321
- Verkhatsky, A., and Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* 98, 239–389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., et al. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer* 8, 761–773. doi: 10.7150/jca.17648
- Watkins, S., Robel, S., Kimbrough, I. F., Robert, S. M., Ellis-Davies, G., and Sontheimer, H. (2014). Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat. Commun.* 5:4196. doi: 10.1038/ncomms5196
- Wei, R., Liu, S., Zhang, S., Min, L., and Zhu, S. (2020). Cellular and Extracellular Components in Tumor Microenvironment and Their Application in Early Diagnosis of Cancers. *Analyt. Cell. Pathol.* 2020, 1–13. doi: 10.1155/2020/6283796
- Wesseling, P., and Capper, D. (2018). WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 44, 139–150. doi: 10.1111/nan.12432
- Whiteside, T. L. (2017). The effect of tumor-derived exosomes on immune regulation and cancer immunotherapy. *Future Oncol.* 13, 2583–2592. doi: 10.2217/fon-2017-0343
- Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., et al. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 17513–17518. doi: 10.1073/pnas.0602841103
- Willingham, S. B., Hotson, A. N., and Miller, R. A. (2020). Targeting the A2AR in cancer; early lessons from the clinic. *Curr. Opin. Pharmacol.* 53, 126–133. doi: 10.1016/j.coph.2020.08.003
- Wink, M. R., Braganhol, E., Tamajusuku, A. S. K., Casali, E. A., Karl, J., Barreto-Chaves, M. L., et al. (2003). Extracellular adenosine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem. Int.* 43, 621–628. doi: 10.1016/S0197-0186(03)00094-9
- Wink, M. R., Braganhol, E., Tamajusuku, A. S. K., Lenz, G., Zerbini, L. F., Libermann, T. A., et al. (2006). Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience* 138, 421–432. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.11.039
- Yan, A., Joachims, M. L., Thompson, L. F., Miller, A. D., Canoll, P. D., and Bynoe, M. S. (2019). CD73 promotes glioblastoma pathogenesis and enhances its chemoresistance via A2B adenosine receptor signaling. *J. Neurosci.* 39, 4387–4402. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1118-18.2019
- Yao, M., Li, S., Wu, X., Diao, S., Zhang, G., He, H., et al. (2018). Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cell. Mol. Immunol.* 15, 737–739. doi: 10.1038/cmi.2017.159
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., et al. (2012). Genomic Analysis of Reactive Astroglia. *J. Neurosci.* 32, 6391–6410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012
- Zarrinmayeh, H., and Territo, P. R. (2020). Purinergic Receptors of the Central Nervous System: biology, PET Ligands, and Their Applications. *Mol. Imaging* 19, 1–26. doi: 10.1177/1536012120927609
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., and Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 9, 1–18. doi: 10.1186/s13578-019-0282-2
- Zorec, R., Verkhatsky, A., Rodríguez, J. J., and Parpura, V. (2016). Astrocytic vesicles and gliotransmitters: slowness of vesicular release and synaptobrevin2-laden vesicle nanoarchitecture. *Neuroscience* 323, 67–75. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.033

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Debom, Rubenich and Braganhol. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ARTIGO CIENTÍFICO 2**CD73 INHIBITION POTENTIATES THE CYTOTOXIC EFFECT OF
RADIOTHERAPY IN GLIOBLASTOMA**

Gabriela Nogueira Debom¹, Juliana Hofstatter Azambuja², Saigopalakrishna Yerneni³, Lisa M. Maurer², Hannah Elizabeth Butterfield², Jordana L. Domagalski¹, Jackson Argenta⁴, Ana Charão⁴, Neiro Motta⁴, Peter C. Lucas²; Linda M. McAllister-Lucas², Gary Kohanbash⁵, Elizandra Braganhol^{1*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Department of Pediatrics, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA.

³Department of Chemical Engineering, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, USA.

⁴Serviço de Radioterapia, Hospital Santa Rita, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵Department of Neurological Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

*Corresponding Author

Elizandra Braganhol, PhD (ebbraganhol@ufcspa.edu.br)

Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA)

Sarmiento Leite, 245 – Main Building – Room 304

Zip code: 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3303 8762

Manuscrito formatado para submissão no periódico Purinergic Signalling

Endereço eletrônico da publicação na revista:

<https://link.springer.com/journal/11302>

Fator de impacto: 3.95

CD73 inhibition potentiates the cytotoxic effect of radiotherapy in glioblastoma

Gabriela Nogueira Debom¹, Juliana Hofstatter Azambuja², Saigopalakrishna Yerneni³, Lisa M. Maurer², Hannah Elizabeth Butterfield², Jordana L. Domagalski¹, Jackson Argenta⁴, Ana Charão⁴, Neiro Motta⁴, Peter C. Lucas²; Linda M. McAllister-Lucas², Gary Kohanbash⁵, Elizandra Braganhol¹.

¹Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Department of Pediatrics, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA.

³Department of Chemical Engineering, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, USA.

⁴Serviço de Radioterapia, Hospital Santa Rita, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵Department of Neurological Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

*Corresponding Author

Elizandra Braganhol, PhD (ebraganhol@ufcspa.edu.br)

Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA)

Sarmento Leite, 245 – Main Building – Room 304

Zip code: 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3303 8762

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; process number 19/2551-0001779-0; 22/2551-0000388-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; code 001; process number 88881.622753/2021-01), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq process number 315522/2021-6; 403299/2022-5; 408725/2023-0). This research was made possible through the generous support of JHA and LMM for their contribution to experimental delineation, JA, AC, and NM for contributing to the irradiation of cells, and GK, PCL, and LMMc-L for supporting and providing expert advice and suggestions on the manuscript.

Gabriela Nogueira Debom graduated in Biotechnology and has a master's degree in Biochemistry and Bioprospection, both from the Federal University of Pelotas, Brazil. She is currently studying for a PhD at the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Brazil, focusing on the characterization of adenosinergic signaling in the tumor microenvironment of glioblastomas. She is also interested in investigating the effects of adenosine pathways modulation with the aim of improve glioblastoma therapeutics.



Abstract

Glioblastoma represents the main cause of malignant primary tumors in the central nervous system of adults. Radiotherapy, a successful and cost-effective treatment for glioblastoma, utilizes ionizing radiation (IR) to induce cytotoxic effects on the tumor cells. Despite the beneficial effects of this therapeutical intervention in improving the life expectancy of patients, several studies pointed out the potential of IR in modulating the tumor niche, establishing an association between this modulation to the usual occurrence of molecular radioresistance to treatment. The tumor microenvironment of glioblastoma involves the intricate interactions between the tumor and the immune, endothelial, and glial cells around the tumor. Cytokines and growth factors secreted by these cells help the tumor escape from immunosurveillance and foster an immunosuppressive state that supports tumor growth. Adenosine, a component of purinergic signaling, has a crucial role in the immunomodulation of the brain. Adenosine is produced by the enzymatic activity of CD73, and inhibiting CD73 has shown efficacy in reducing tumor growth and aggressiveness. The present study aimed to investigate the impact of CD73 inhibition in combination with ionizing radiation on glioblastoma cell lines. Results revealed that IR increases extracellular ATP release, and the concurrent CD73 inhibition with radiation effectively suppresses tumor growth. In addition to that, IR increased CD73 expression and enzymatic activity in GB cells. These findings suggest a very interesting adjuvant effect of adenosine production modulation and IR exposition, providing insights into a potential adjuvant strategy using CD73 inhibition to enhance the antitumor effects of radiotherapy in glioblastoma management.

Keywords: Glioblastoma, radiotherapy, CD73, adenosine.

1. Introduction

Glioblastoma (GB) is the most common primary brain tumor in adults, representing almost half of the malignant tumors found in the Central Nervous System (CNS) [1, 2]. The conventional treatment protocol includes surgical resection, followed by radiotherapy and chemotherapy using temozolomide [3]. The clinical management of GB is limited due to the invasive nature of the tumor and its usual resistance to standard therapies [4]. In addition to that, GB is classified as a cold tumor, showing a poor response to more specific treatments such as immunotherapy [5, 6]. For those reasons, GB patients continue to present a devastating prognosis of 15 months of life [3].

Radiotherapy is a clinically successful and cost-effective therapy for GB [7, 8]. This treatment modality is characterized by the use of ionizing radiation (IR) on the tumor site, causing cytotoxic effects by disrupting DNA integrity [9]. Radiotherapy has a well-established role in improving patient survival and symptom management [10, 11]. Despite that, the use of IR is associated with a very relevant resistance level, and the complex interplay of intrinsic and acquired mechanisms involving radioresistance remains not well-defined [12, 13].

Recent studies have increasingly emphasized the crucial role of the tumor microenvironment (TME) in the progression and resistance to the therapeutics of GB [11, 14]. The TME consists of a complex interplay between tumor cells and noncancerous cell types around the tumor, including immune cells, endothelial cells, fibroblasts, and, in the case of glioblastoma, glial cells [15, 16]. The array of cytokines, growth factors, and extracellular matrix proteins secreted by the multiple cells in the tumor niche leads to an immunosuppression state, facilitating tumor growth [17].

Purinergic signaling has been described as a relevant inflammatory cancer-associated pathway in the TME of GB. Purinergic enzymes CD39 and CD73 located in the surface of tumor and non-tumor cells are responsible for controlling the extracellular levels of ATP and its products of hydrolysis, ADP, AMP, and adenosine (ADO) [18, 19]. ATP is a well-known *danger-associated molecular pattern* (DAMP) related to proinflammatory conditions, and ADO is an important immunomodulatory molecule, been extensively associated with the escape of tumor cells from immunosurveillance in the brain and GB progression [20].

The pronounced relevance of ADO in the TME has been proved by several authors in the literature that describes the effectiveness of using selective inhibitors of both ADO

formation and ADO receptors in reducing tumor growth and aggressiveness [20–22]. In addition to that, the effect of the CD73/ADO axis has been extensively studied by our group in the past few years [23–26]. Considering the significant use of radiotherapy in the management of GB and the relation to the level of ATP released from necrotic cells on the tumor site, we aimed to determine the effects of CD73 inhibition combined with IR in ATP and adenosine production on GB cell lines. We were able to observe that the concomitant effect of CD73 inhibition combined with radiation is capable of suppressing tumor growth. These data contribute to improving the antitumor effect of radiotherapy giving light to an alternative pathway using CD73 inhibition as an adjuvant therapy.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Chemicals applied in the present study were described in the supplementary Table 1. All other chemicals and solvents were obtained from standard commercial suppliers with analytical grade standards and were used as received.

2.2 Cell lines and culture procedures

Mouse GL261 and CT-2A GB cell lines were obtained from the National Cancer Institute-Frederick Cancer Research Tumor Repository and Merck/Sigma-Aldrich, respectively. The mouse SBGB cell line was established in the laboratory of Dr. Gary Kohanbash using the *Sleeping Beauty* transposon system. This genetic tool was used to develop a tumor cell line containing genetic alterations related to glioblastoma (*NRAS*, *p53*, and *PDGFB*). All the steps associated with SBGB cell line production were performed as described in the literature [27, 28]. Cells were grown in culture flasks and maintained in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, catalog nr 11965092) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco, catalog nr 16140071). Cells were kept at 37°C with 95% minimum relative humidity and 5% CO₂. Early passages were used in all experiments.

2.3 Experimental groups and treatment conditions

GB cell lines were exposed to 2 major experimental conditions: CD73 pharmacological inhibition using adenosine 5'-(α,β -methylene)diphosphate sodium salt (APCP; Tocris,

catalog nr: 3633) and/or irradiation. APCP was diluted in DMEM/10% FBS to obtain the working concentrations (1, 10, and 100 μ M). Irradiation was performed in X-RAD 320 (Precision X-ray Inc) using Filter 2 (1.5 mm Al + 0.25 mm Cu + 0.75 mm Sn) at increasing doses (1, 2, and 5 Gy). The analysis was performed containing the following experimental groups: **(a)** untreated GB cells cultured in DMEM/10% FBS at standard conditions (negative control); **(b)** GB cells exposed to irradiation; **(c)** GB cells exposed to APCP; and **(d)** GB cells exposed to combined treatment with APCP and irradiation. The exposition time of the treatments is shown below. The conditions of irradiation exposition and the doses were chosen in concordance with the literature [29], as the same for APCP treatment [24, 30].

2.4 Flow Cytometry Analysis

GL261, CT-2A, and SBGB GB cells (1×10^6 cells/well) were seeded into 6-well plates, at a final volume of 2000 μ L of DMEM/10% FBS. GB cell lines untreated or exposed to APCP (100 μ M) and/or irradiation (5 Gy) as described above (item 2.3) were detached from culture flasks using Trypsin-EDTA 0.05% (Gibco, catalog no: 25300054) and washed with cold DPBS (Lonza, catalog no: BW04-479Q) to remove the remaining culture media. After that, cells were pellet by centrifugation and resuspended in FACs Buffer (DPBS containing 1% FBS). Cells were stained for CD39 (PE, Biolegend, catalog no: 143803; dilution 1:20), and for CD73 (PerCP/Cyanine5.5, Biolegend, catalog no: 127213; dilution 1:80) per 1×10^6 cells in a final volume of 100 μ L FACs buffer. After 30 min of incubation at 4°C, cells were washed using FACs buffer and resuspended in cold DPBS for the flow cytometry analysis. The CD39 and CD73 expression was determined using a BD LSR Fortessa (BD Biosciences), and FlowJo software (BD Biosciences) was used for data analysis. Data were expressed by both the percentage of CD39 or CD73 positive cells and MFI of fluorescent staining.

2.5 GB cell confluence analysis

For the confluence analysis over time, GL261, CT-2A, and SBGB GB cells (5×10^3 cells/well) were seeded into 96-well plates at a final volume of 100 μ L of DMEM/10% FBS. Immediately after seeding, plates were placed under the incubator IncuCyte S3 (Sartorius) where phase contrast images were obtained at 8 h intervals to determine cell growth. Cells were cultured for 16 h and then treated with APCP followed by the

irradiation exposure as described above (item 2.3) and returned to IncuCyte S3 to continue the image acquisition for an additional 96 h. Cells were maintained under culture until negative control (untreated cells) achieved 60-80% confluency in the well, depending on the cell line characteristics. The data were expressed as a percentage of cell confluence.

2.6 Immunoblot Assay

CT-2A GB cells (1×10^6 cells/well) were seeded into 6-well plates, at a final volume of 2000 μ L of DMEM/10% FBS. Cells were exposed to APCP (100 μ M) and/or irradiation (5 Gy) as described above (item 2.3). Untreated cells were considered control. Cell lysates were prepared using RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, catalog no: 89901) containing HALT Protease and Phosphatase Inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, catalog no.: 78440) as previously described [29]. Samples were loaded in 4% to 15% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels (BioRad, catalog no: 4561084), transferred to 0.2 mm nitrocellulose membranes (BioRad, catalog no: 1620112) and blocked with 5% milk in TBST buffer. Membranes were incubated overnight with primary antibody CD73 (Cell Signaling, catalog no: 13160, dilution 1:1,000) and Vinculin (Invitrogen, catalog no: 700062, dilution 1:1,000) in 2.5%–5% milk (or BSA for phospho-antibodies)/TBST at 4°C. Band intensities were detected by adding ECL reagent (Thermo Fisher Scientific, catalog no: 32106). Densitometry analysis of bands was performed using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov>). The data were expressed as the CD73/vinculin band intensity ratio.

2.7 Enzyme activity measurement

CT-2A cells were plated in 48-well plates (5×10^3 cells/well), and they were allowed to grow for 72h to achieve 60-70% of confluency. Therefore, cell cultures were exposed to APCP (100 μ M) and/or irradiation as previously described (item 2.3). After 48 h of treatment, ATPase, ADPase, and AMPase activities were analyzed as described by Azambuja and colleagues [25, 31]. Briefly, CT-2A cells were incubated with ATP, ADP, or AMP (2 mM; 10 min) in an incubation medium containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES (pH 7.4) and 2 mM CaCl_2 (for ATP and ADP) or 2 mM MgCl_2 (for AMP) at 37°C. The release of inorganic phosphate (Pi) was determined by the Malachite Green method [32] using KH_2PO_4 as standard. Total protein content was

measured according to Bradford [33] using serum albumin as the standard. The specific activity is expressed as nmol Pi/min/mg of protein.

2.8 Statistical analysis

All quantitative data were analyzed using GraphPad Prism software (v9.0). Values are expressed as mean $\pm$ SD. Differences between groups were assessed by one-way ANOVA or two-way ANOVA with *post hoc* analysis when appropriate. Differences were considered significant for $p < 0.05$. Figures were created using the same software.

3. Results

3.1 The expression of the CD39-CD73 axis varies among CT-2A, GL261, and SBGB GB cell lines

The CD39-CD73 axis is the main source of extracellular ADO and its participation in GB progression has been shown by our group [34]. Therefore, our first goal was to investigate the levels of CD39 and CD73 in a panel of well-established GB cell lines characterized by differential driver mutations - GL261 (p53/K-RAS-mutated, c-myc-overexpressed), CT-2A (p53-WT and PTEN-deficient), and SBGB (p53-deleted, N-RAS/PDGFB-overexpressed) (Fig. 1a-d). Figure 1 (panel a) shows the representative dot-plot of flow cytometry analysis performed in GB cells, while the quantification is presented in panel b. The analysis reveals that GL261 and CT-2A exhibit low CD39 expression when compared to SBGB (0.32, 0.73, and 24.5% of CD39⁺ cells, respectively; Fig.1b). Although there is a tendency of CD73 overexpression in CT-2A when compared to the other cell lines, there is no significative difference among the groups when flow cytometry analysis was applied. Interestingly, the WB analysis indicates higher CD73 expression in CT-2A cells compared to GL261 (Fig. 1c-d). Taken together, these data showed that the CD39-CD73 axis is differentially expressed by GB cell lines investigated, which could be related to the biological and genetic characteristics exhibited by each cell line.

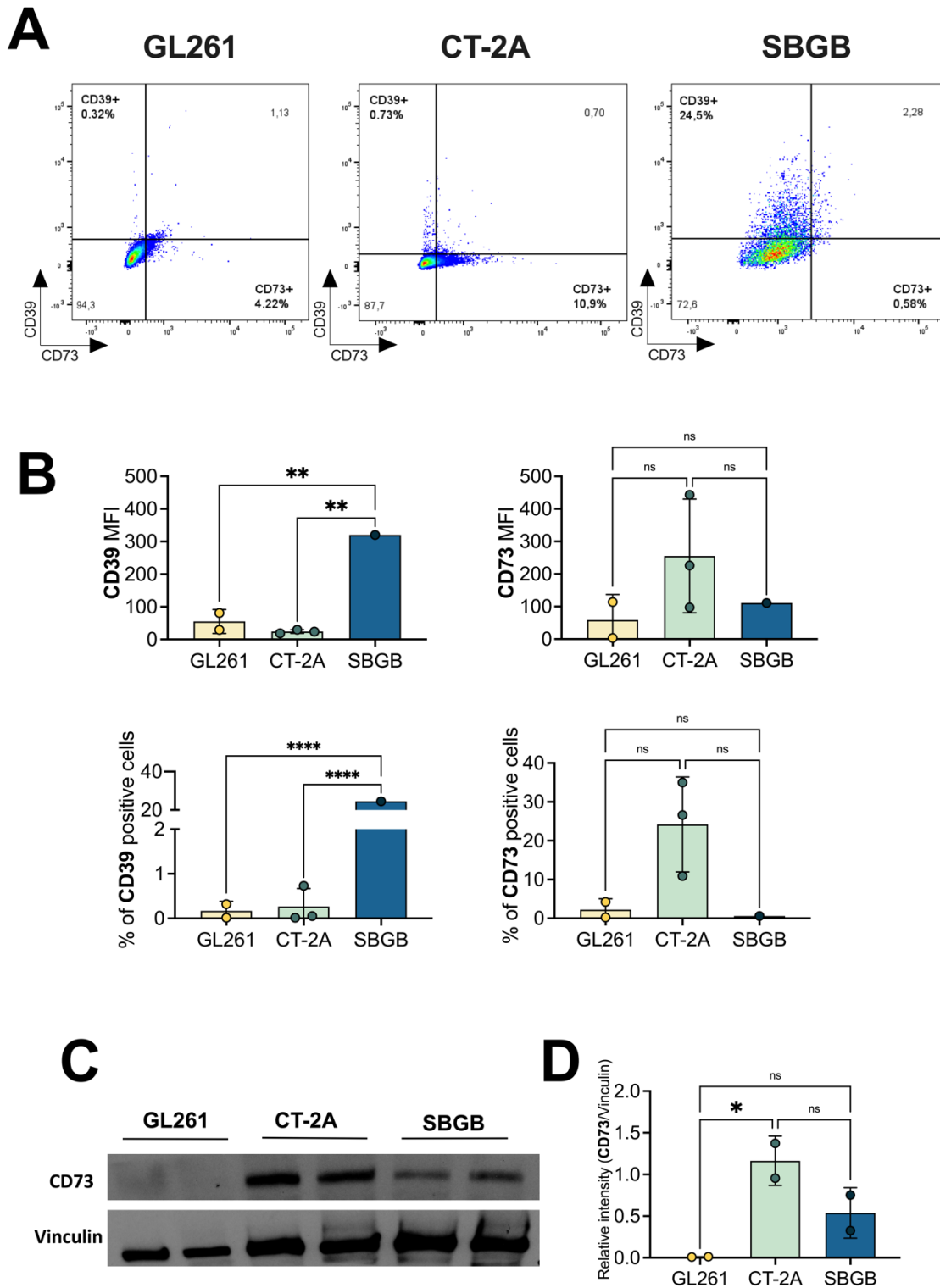


Fig. 1 Expression levels of CD39 and CD73 enzymes in three different glioblastoma cell lines: GL261, CT-2A, and SBGB. Flow cytometry was performed using anti-CD39 and anti-CD73 antibodies, and (a) shows the dot plot of CD39 positive cells and CD73 positive cells. In (b) is represented the median fluorescence intensity (MFI) and the percentage of positive cells for the two enzymes. Western blot of CD73 basal protein

expression in the three cell lines is represented in (c), and (d) is the quantification graphic. Vinculin was used as endogenous control of protein expression. Protein levels are represented as mean ratio values quantified from protein bands of CD73 versus Vinculin. All the data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc, and are represented by mean $\pm$ SD. NS is non-significative; * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; **** $p < 0.00005$.

3.2 The combined inhibition of CD73 and irradiation significantly impact the growth rate of various glioblastoma (GB) cell lines over time

Subsequently, we aimed to explore the enhanced efficacy of CD73 inhibition in suppressing tumor growth when combined with radiation treatment. To examine this, we exposed GL261, CT-2A, and SBGB GB cell lines to increasing concentrations of APCP (1, 10, or 100 μ M), a CD73 inhibitor, in the presence or absence of irradiation (1, 2, and 5 Gy). In Figures 2, 3, and 4 is possible to see cell confluence over time in 1, 2, and 5 Gy of radiation, for all the concentrations of APCP treatment.

The confluence of the GL261 cell line is shown in Figure 2. It is possible to notice that the tumor cells presented a slower growth rate after receiving the higher concentration of APCP treatment (100 μ M) with or without radiation, excepting the 2 Gy dose. The cell confluence of CT-2A over time is represented in Figure 3. We were able to see that CT-2A cells that received the APCP at 100 μ M concentration presented a significant difference in their growth rate only when exposed to radiation at 5 Gy, suggesting a very relevant concomitant effect of CD73 inhibition combined with radiation. SBGB cell line did not show any differences in the tumor growth rate over time after both treatment (Figure 4).

Figure 5 demonstrates the cell confluency of the three cell lines over time comparing the groups that received APCP at 100 μ M concentration according to the level of irradiation. It is possible to note that CT-2A cell line showed a significantly smaller growing rate with the 2 Gy and 5 Gy radiation level. Heatmaps of each cell line were created to better show the difference of cell confluency in CT-2A cell line, and that this effect was not observed clearly neither in GL261 and SBGB cell lines. Furthermore, in supplementary Figure 1 is shown the timeline of CT-2A confluency in negative control group and after irradiation.

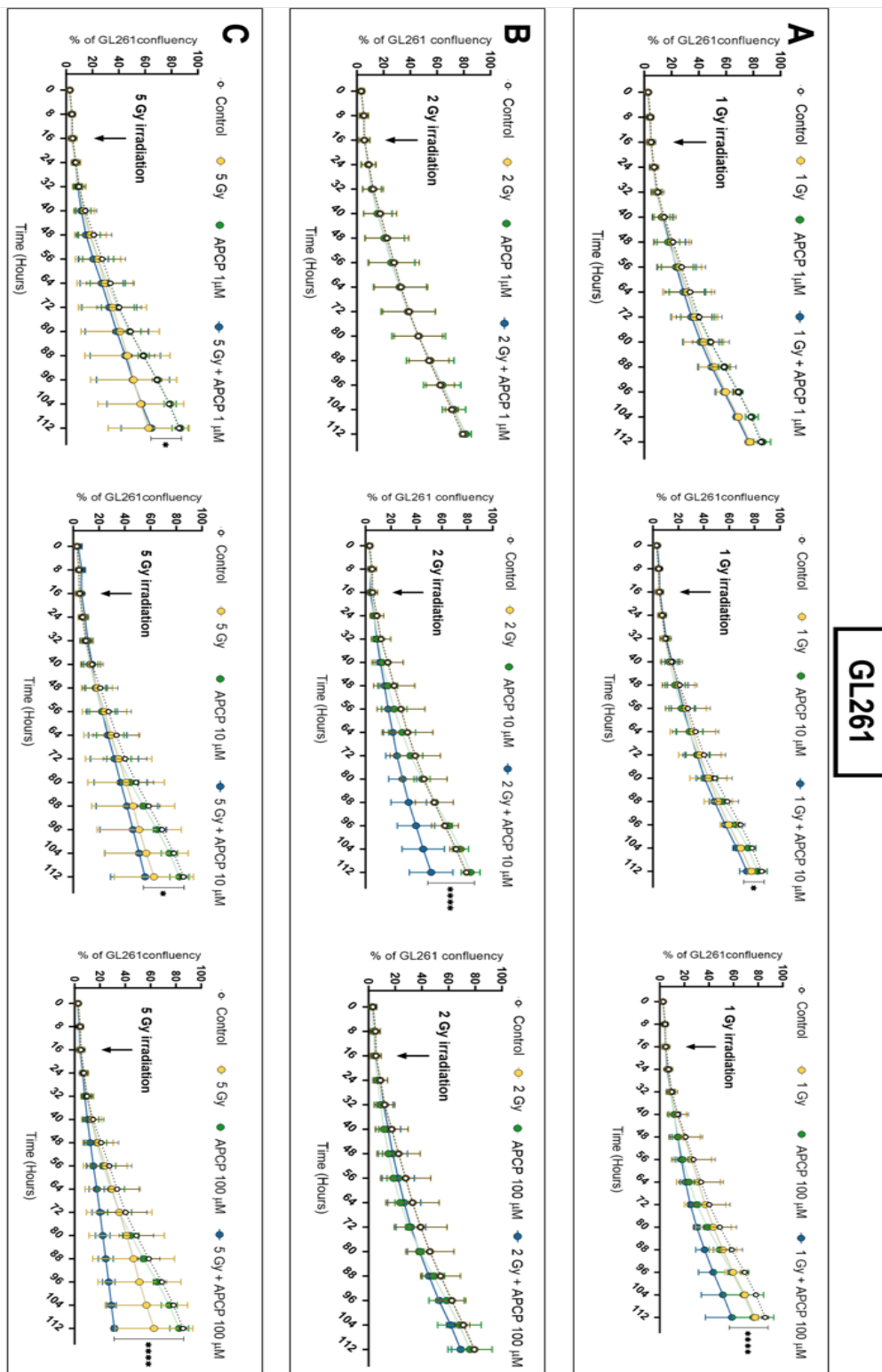


Fig. 2 GL261 confluency over time after APCP treatment at 1, 10 e 100μM combined with irradiation. Graphic representation of cells irradiated with 1, 2, and 5 Gy, respectively, in (a), (b), and (c). Data were analyzed by two-way ANOVA, and Bonferroni post hoc, and is represented by mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$; **** $p < 0.00005$.

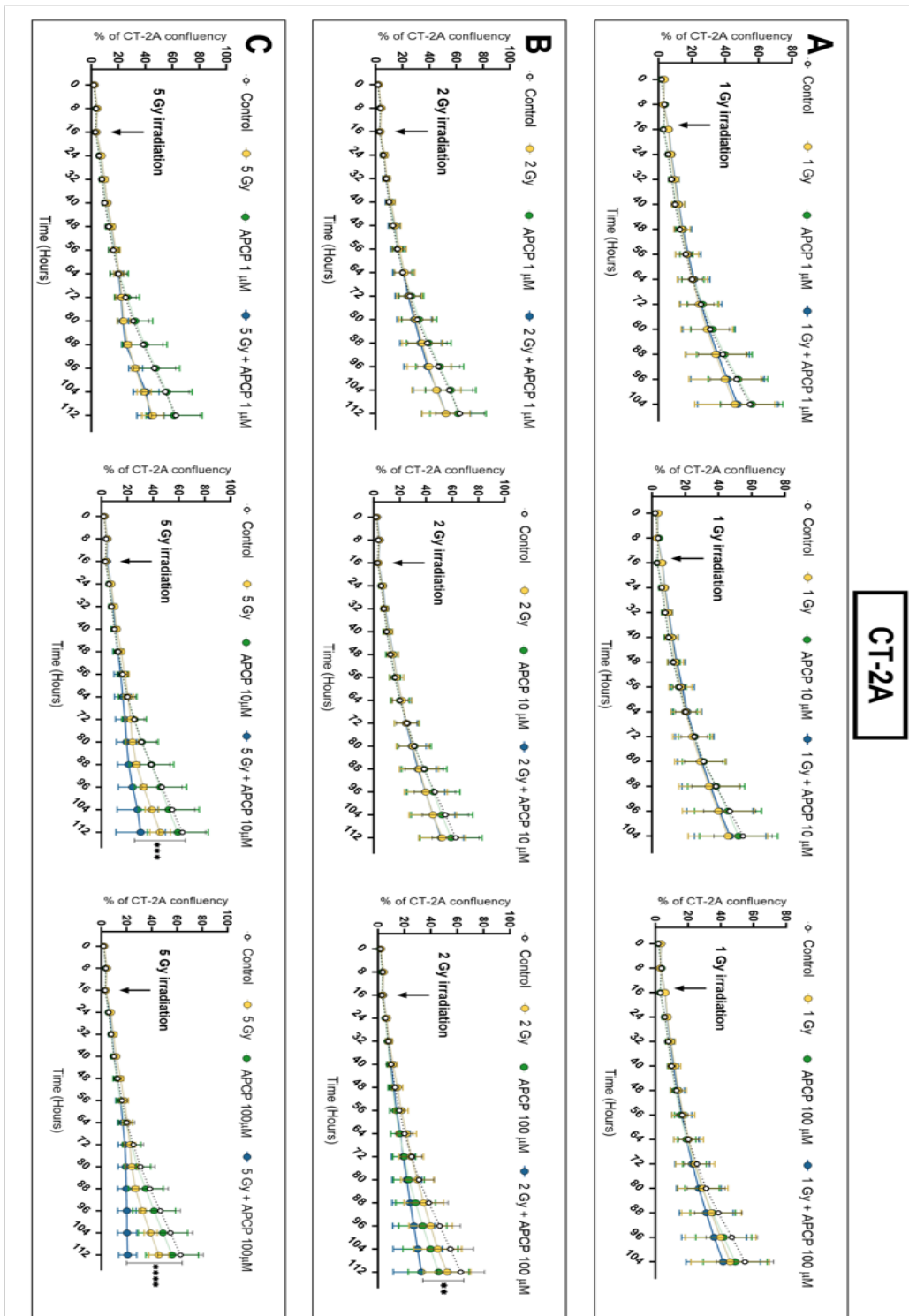


Fig. 3 CT-2A confluency over time after APCP treatment at 1, 10 e 100 μ M combined with irradiation. (a) Graphic representation of cells irradiated with 1, 2, and 5 Gy, respectively, in (a), (b), and (c). Data were analyzed by two-way ANOVA, and Bonferroni post hoc, and is represented by mean $\pm$ SD. ** $p < 0.005$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.00005$.

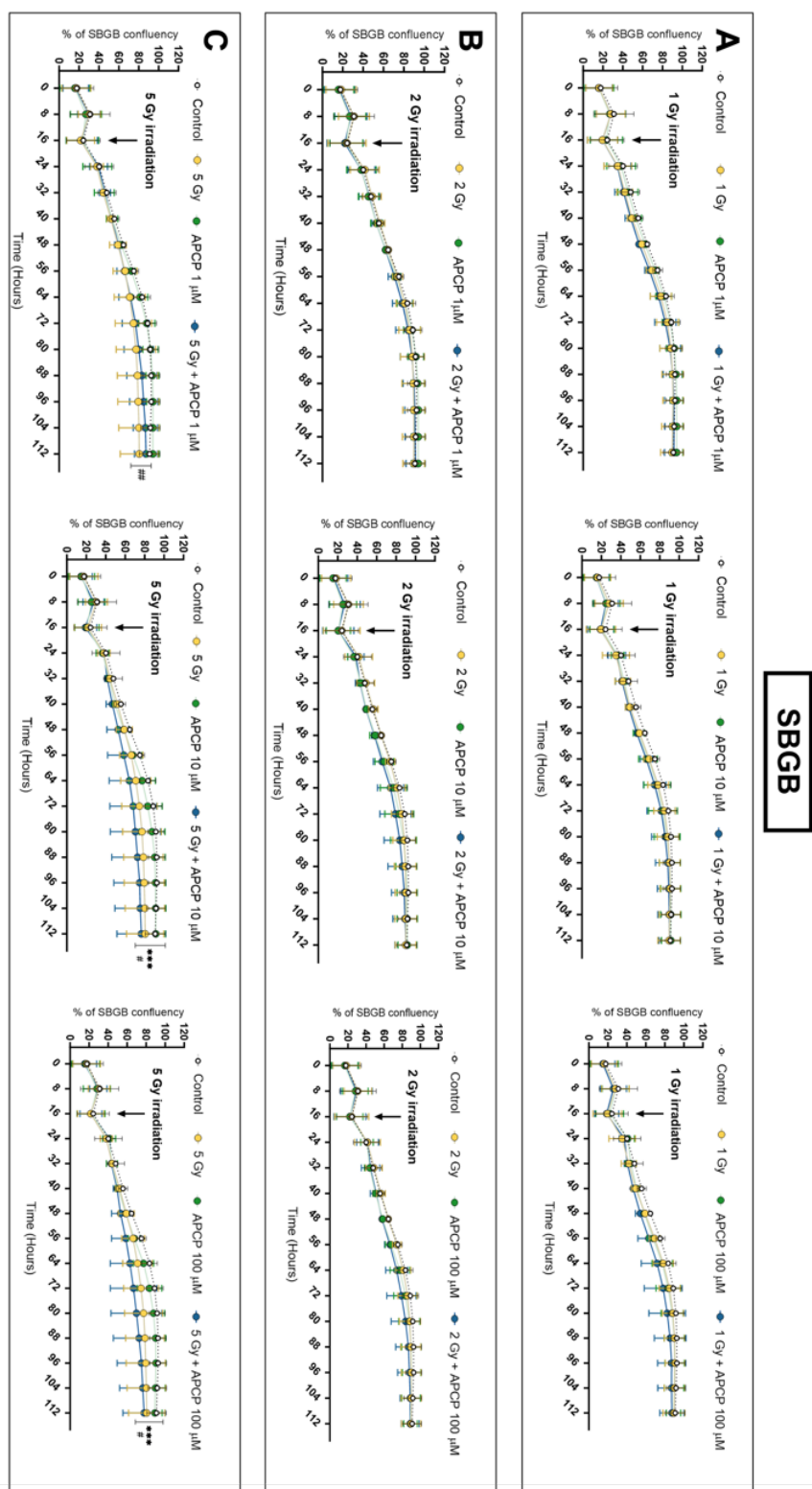


Fig. 4 SBGB confluency over time after APCP treatment at 1, 10 e 100μM combined with irradiation. (a) Graphic representation of cells irradiated with 1, 2, and 5Gy, respectively, in (a), (b), and (c). Data were analyzed by two-way ANOVA, and Bonferroni post hoc, and is represented by mean $\pm$ SD. **** represents difference from

the control group ($p < 0.00005$); # represents difference comparing 1 and 100 μM experimental groups (p).

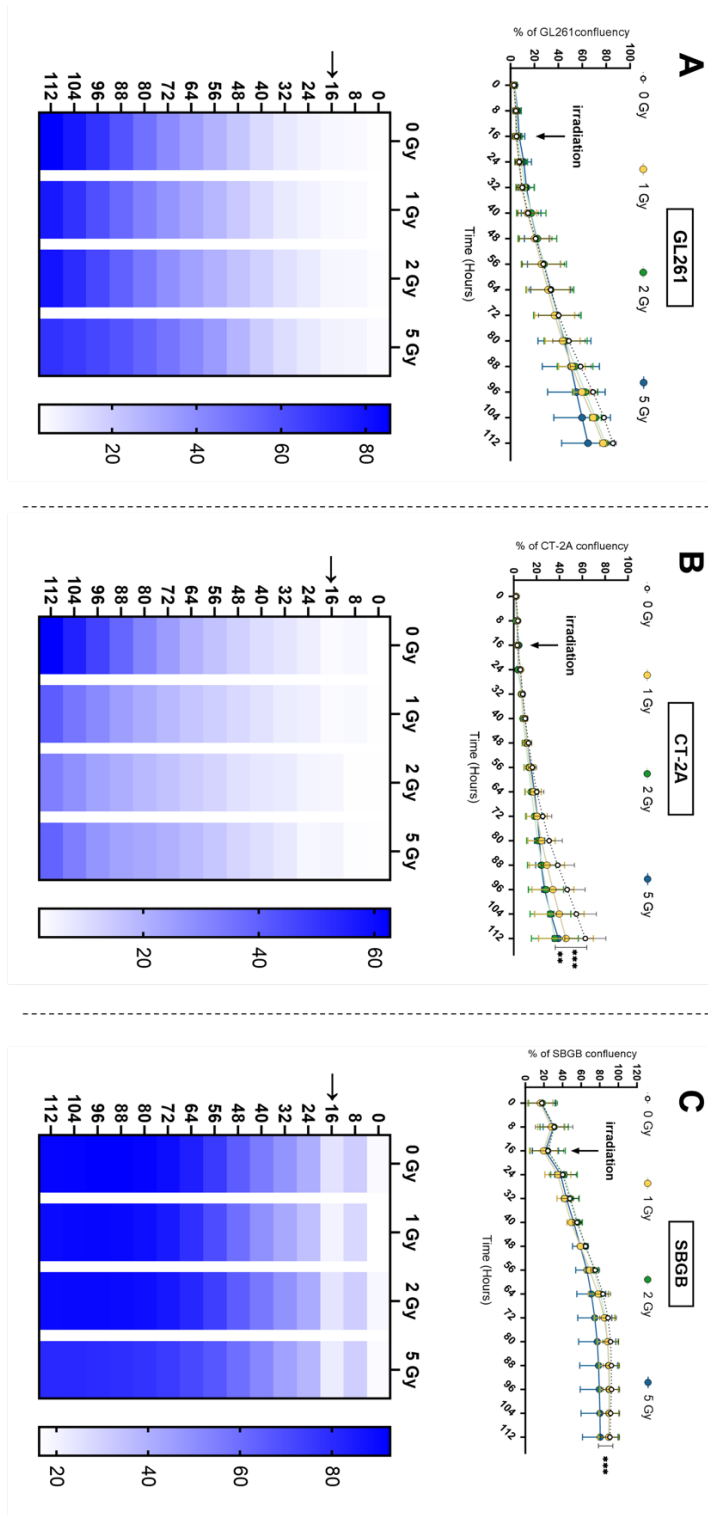


Fig. 5 Cell confluency over time after APCP treatment at a concentration of 100 μM . (a) Graphic representation of GL261 cells irradiated with 1, 2, and 5 Gy, compared with

negative control. (b) Graphic representation of CT-2A cells irradiated with 1, 2, and 5 Gy, compared with negative control. (c) Graphic representation of SBGB cells irradiated with 1, 2, and 5 Gy, compared with negative control. Above each cell line graphic, heatmaps displays the cell confluency (scale indicated). The timepoint of 16h represents the irradiation. Data were analyzed by two-way ANOVA, and Bonferroni post hoc, and is represented by mean $\pm$ SD. ** $p < 0.005$; *** $p < 0.005$.

3.3 Radiation affects CD73 expression levels of CT-2A tumor cell line, and APCP treatment is not able to change this effect.

Our next step was to investigate if radiation exposition was able to affect CD73 levels differently in cells treated with APCP. Given the results already demonstrated, we choose to investigate this effect using CT-2A cell line. Figure 5 shows the results from flow cytometry, represented by the percentage of positive cells for CD73 and the relative intensity (MFI) of CD73. In (a) cells received APCP at 100 μ M concentration for 48h, and in (b) for 72h. We could see that both treatment times demonstrated an increase in CD73 expression in CT-2A cells after 5 Gy of irradiation exposition. However, APCP treatment did not change this effect either in 48h or 72h. The same tendency is observed by western blot, represented in (c) for 48h treatment and (d) for 72h treatment.

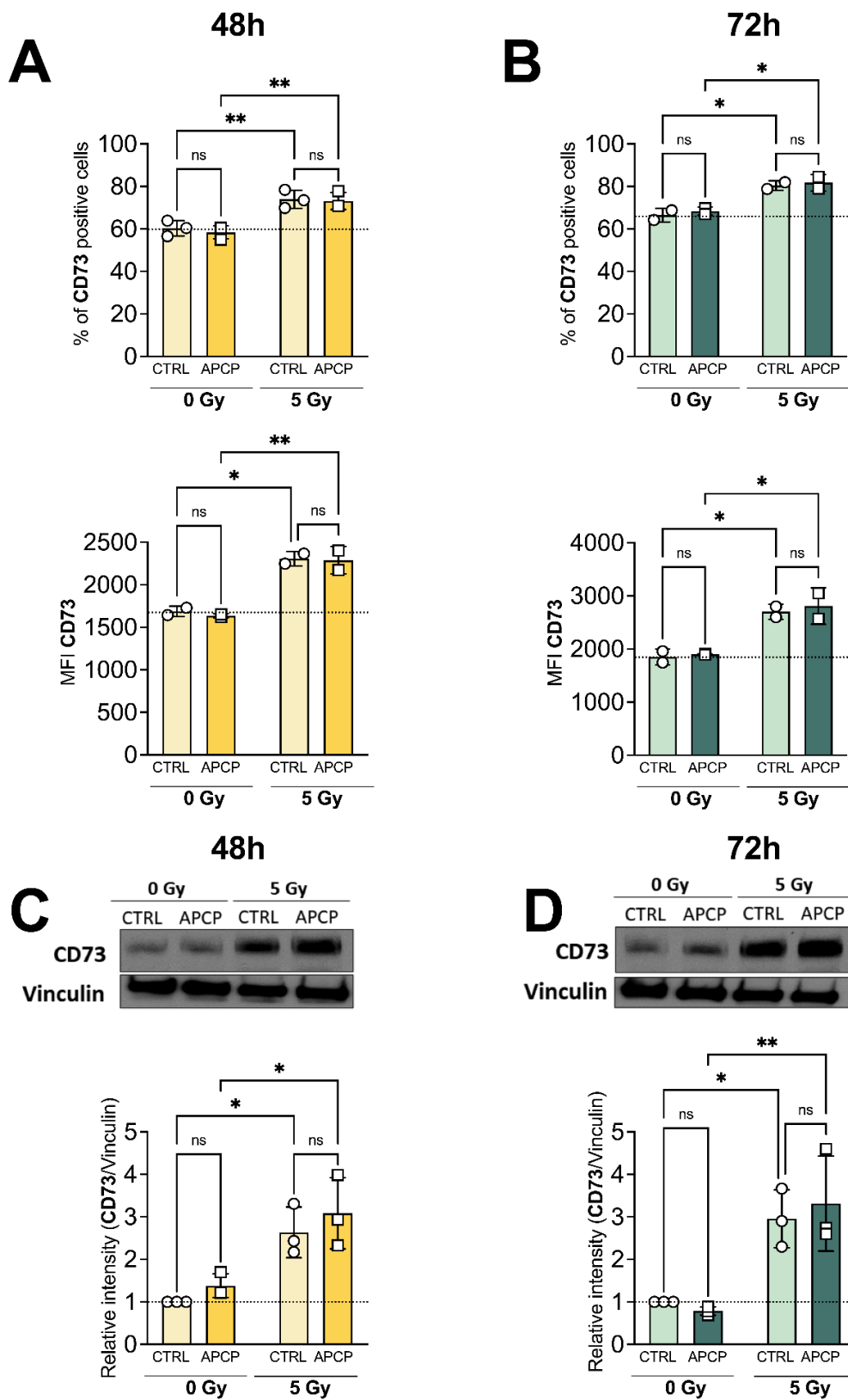


Fig 6 Effects of APCP administration (100 μ M) combined with radiation (5 Gy) in CD73 expression. Graphics (A) and (B) show the percentage of CD73 positive cells and median

fluorescence intensity (MFI) after 48 and 72h. (C) Western blot of CD73 after 48h of APCP administration, and (D) after 72h of treatment. Data were analyzed by one-way ANOVA, and Tukey post hoc, and is represented by mean $\pm$ SD. NS is non-significative; * $p < 0.05$; and ** $p < 0.005$.

3.4 Radiation induces CD39 and CD73 enzymatic activity by increasing ATP, ADP, and AMP hydrolysis, and ADPase activity is reverted by radiation combined with APCP

To determine the capacity of radiation to modulate the activity of purinergic enzymes after radiation exposure, we used the malachite green assay to measure the activities of CD39 and CD73. This method is a colorimetric assay and is based on measuring the quantity of inorganic phosphate released after the CD39 and CD73 hydrolytic activities. Figure 6 shows that (a) ATPase, (b) ADPase, and (c) AMPase activities were increased after exposition to 5 Gy of radiation. APCP treatment in combination with radiation showed a reversion of this increase in ADPase activity. However, the ATP and AMP hydrolysis was not affected by APCP administration in combination with radiation.

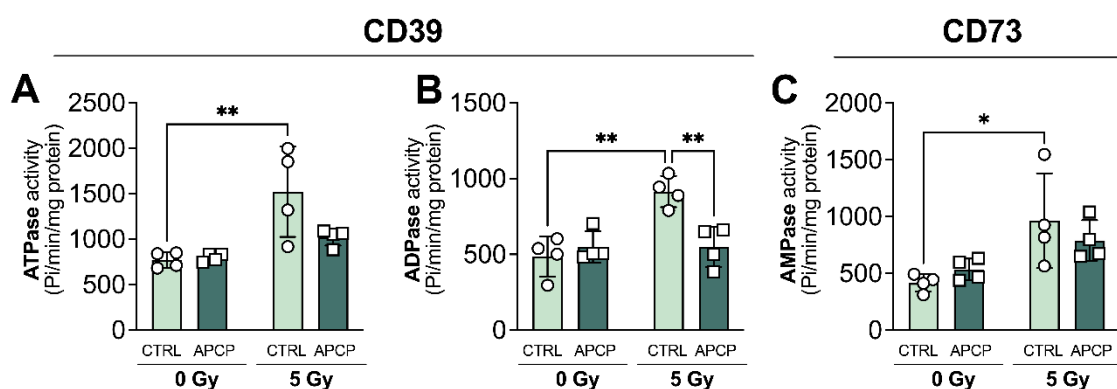


Fig 7 Effects of APCP administration (100 μ M) combined with radiation (5 Gy) in CD39/CD73 enzymatic activity after 72h. (a) represents ATPase activity, (b) ADPase activity, both related to CD39 enzyme activity, and (c) the AMPase activity, related to CD73 enzyme activity. Data were analyzed by two-way ANOVA, and Bonferroni post hoc, and is represented by mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$; and ** $p < 0.005$.

4. Discussion

In the present study, we aimed to better understand the role of purinergic signaling in the viability and growth rate of GB cell lines after exposition to IR, indicating how irradiation affects ADO production in the tumor site. We were able to show that tumor cells exposed to IR presented a relevant increase in CD73 expression in contrast with cells not exposed, even when irradiated cells were treated with APCP, a CD73 pharmacological inhibitor. Further, we demonstrated that IR was effective in modulating tumor cell growth *in vitro*, and the CD73 inhibition potentiated the cytotoxic effects observed after IR exposition. These findings reveal a very interesting combined effect observed in cells exposed to 5 Gy and 100 μ M of APCP.

We first demonstrated that GB cell lines present differences in expression levels of purinergic enzymes. All three cell lines chosen for the present study are murine cells, derived from C57BL-6 mice. Although GL261 and CT-2A are both classical and fully characterize mouse glioma cell lines [35, 36], the different genetic alterations of these two cell lines explain the variability found in the levels of CD39 and CD73 in basal conditions. GL261 histologically resembles ependymoblastomas, however this cell line closely mimics GB genetic mutation, and the presence of mutations in K-ras oncogene and p53 tumor suppressor gene results in increased activated c-myc [36]. In contrast to that, CT-2A tumors are described by the high similarity with neural stem cells, histologically exhibiting a phenotype of high-grade astrocytoma, and presenting positive stain for p53, GFAP, Sox9, and Sox10 [37].

The SBGB is a cell line generated using the *Sleeping Beauty transposon* system. This method consists of inducing spontaneous brain tumors in mice by the intracranial injection of transposon vectors expressing a gene of interest [28, 38]. Recently, this genetic model has been used for *in vitro* and *in vivo* experiments related to chemotherapy resistance and immune checkpoint therapies for GB [27, 39, 40]. In the present work, we used transposons for *NRAS*, *p53*, and *PDGFB*, all relevant oncogenes/tumor suppressor genes related to GB pathophysiology [41]. We demonstrated for the first time the expression level of CD39 and CD73 in an SBGB cell line. Interestingly, the SBGB showed a very low expression level of CD73 when compared with the other two cell lines. In addition to that, the level of CD39 was expressively high compared to the other GB cell lines. This could be explained by the genetic mutations of the cell, especially in the *PDGFB* pathway, conferring a different expression on the purinergic enzymes [42]. We

emphasize the need for more investigation into how enzymes and other purinergic markers such as receptors are expressed in this new GB cell line.

Subsequently, we investigated the effects of CD73 inhibition on tumor cytotoxicity in face of IR exposition. We noted cell damage in the tumor cells exposed to 5 and 10 Gy of radiation, and no significant difference between these groups was observed (data not shown). In this way, the dose of 5 Gy was considered the most appropriate to perform the next experiments, in a way to caused cell damage due to radiation and in a sufficient time to show differences in the cell treatments. Additionally, the same radiation level is described in other experiments in the literature [29].

Radiotherapy continues to be one of the treatment pillars for GB and has a positive impact on patient's therapeutics [11]. Unfortunately, the use of IR against tumor cells struggles with the complexity of TME, and factors such as modifications in the vasculature and the presence of hypoxia in the tumor nich are associated with a high incidence of radioresistance [43]. In this way, it became evident the need for adjuvant therapy to enhance the impact of radiotherapy in GB patients.

The high expression of CD73 has been described as a key factor in the modulation of immune-suppressed TME of GB [44]. CD73 is a purinergic enzyme located in the membrane of diverse cells, including immune, glial, and tumor cells, and regulates the extracellular levels of ADO in the tumor niche by hydrolysis of extracellular AMP [18, 19]. We previously demonstrated the impact of CD73 downregulation *in vitro* and *in vivo* in parameters of glioma cell migration and invasion by reducing metalloproteinase-2 and vimentin expression [24]. In addition, we have described the potential of CD73 as a promising target for GB treatment using pre-clinical models [25, 26]. The absence of CD73 has also been related to a better response to immunotherapy using checkpoint inhibitors anti-CTL4 and anti-PD-1 in murine models of GB [44].

In this way, in the current work, we demonstrated that CT-2A cells after exposition to radiotherapy presented a slower growing rate, and this phenomenon was significantly potentiated after APCP treatment, suggesting a concomitant effect of 5 Gy radiation and CD73 inhibition. This very interesting effect could be explained by the presence of high levels of ATP derived from IR exposition. ATP has a well-described role in the extracellular environment as a DAMP, being responsible for signaling an alarm for the immune system [45]. After cellular stress, damage, or injury, ATP can be released from necrotic/apoptotic cells, or actively be released by exocytosis of vesicles formed by

the vesicular nucleotide transporter (VNUT) protein or via channel pores of connexin and pannexin hemichannels [46].

In fact, the increase in extracellular ATP levels after IR exposition is described as a potential mediator of toxicity. Elevated ATP levels were related to the post-irradiation toxic effects observed after IR exposition of normal urothelial cells and urothelial cancer cells [47]. In addition, several authors have been suggesting the potential use of certain levels of radiotherapy as an inductor of immunogenic cell death (ICD) to improve the effectiveness of immunotherapy. The reasoning behind this is that, together with other DAMPs, the released ATP could drive anti-tumor immune responses in the TME [48–50].

We further demonstrated that the exposition to 5 Gy of IR increased CD73 protein levels in CT-2A cells in both analyzed time points. The treatment with APCP did not revert this augment in CD73 protein levels, which could be attributed to the fact that APCP is an enzymatic inhibitor and doesn't interfere with the expression of the enzyme. We also showed that IR exposition was able to increase the ATP hydrolysis, and, interestingly, also the ADP and AMP hydrolysis, suggesting that IR favors ATP release, as a DAMP signaling, and the conversion of this molecule by the purinergic cascade leads to ADO formation. In contrast to what we expected, we did not observe a decrease in AMP hydrolysis in cells treated with APCP.

Taking together, our results suggest that cells exposed to radiation presented higher levels of CD73 expression and enzymatic activity. In addition, we were able to see a relevant effect on the growing rate of GB cells after exposition to IR combined with a CD73 pharmacological inhibitor. These results evidenced a promissory effect in inhibiting adenosine production in TME to augment the efficacy of radiotherapy.

Conclusion

Despite the extensive research conducted in the field of cancer in the past years, the treatment for GB continues to be very challenging, and patients still present a devastating life expectancy after diagnosis. Radiotherapy represents a key treatment modality in patient therapeutics, however, the complexity of the environment around the tumor often imitates the efficacy of IR in eliminating tumor cells and controlling GB

progression. Our results showed the potential of CD73 as a target to improve the efficacy of radiotherapy.

Author contributions

GND, JHA, LMM, and EB contributed to the conception and design of the manuscript. GND, JHA, SY, LMM, HEB, and JLD performed the experiments, interpreted the results, and constructed the graphics. The radiation experiments were conducted and/or supervised by JA, AC, NM, PCL, and LMMc-L. The first draft was written by GND. GK and EB supervised the writing of the manuscript. EB is the corresponding author. All authors contributed to the manuscript and approved the submitted version.

Statements and Declarations

Conflict of interest: The authors declare no competing interests.

Data availability The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the paper. Should any raw data files be needed in another format they are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

1. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al (2014) Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 23:1985–1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>
2. Nørøxe DS, Poulsen HS, Lassen U (2016) Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open* 1:e000144. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000144>
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al (2005) Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352:987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
4. Dymova MA, Kuligina E V., Richter VA (2021) Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci* 22:6385. <https://doi.org/10.3390/ijms22126385>
5. Frederico SC, Hancock JC, Brettschneider EES, et al (2021) Making a Cold Tumor Hot: The Role of Vaccines in the Treatment of Glioblastoma. *Front Oncol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.672508>
6. Pant A, Lim M (2023) CAR-T Therapy in GBM: Current Challenges and Avenues for Improvement. *Cancers (Basel)* 15:1249. <https://doi.org/10.3390/cancers15041249>
7. Schaeue D, McBride WH (2015) Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 12:527–540. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.120>
8. Chédeville AL, Madureira PA (2021) The Role of Hypoxia in Glioblastoma Radiotherapy Resistance. *Cancers (Basel)* 13:542. <https://doi.org/10.3390/cancers13030542>
9. Gu J, Mu N, Jia B, et al (2022) Targeting radiation-tolerant persister cells as a strategy for inhibiting radioresistance and recurrence in glioblastoma. *Neuro Oncol* 24:1056–1070. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab288>
10. Weller M, van den Bent M, Preusser M, et al (2021) EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 18:170–186. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00447-z>
11. Wu W, Klockow JL, Zhang M, et al (2021) Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacol Res* 171:105780. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105780>
12. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444:756–760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>
13. Ali MY, Oliva CR, Noman ASM, et al (2020) Radioresistance in Glioblastoma and the Development of Radiosensitizers. *Cancers (Basel)* 12:2511. <https://doi.org/10.3390/cancers12092511>
14. DeCordova S, Shastri A, Tsolaki AG, et al (2020) Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Front Immunol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01402>

15. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, et al (2011) The brain tumor microenvironment. *Glia* 59:1169–1180. <https://doi.org/10.1002/glia.21136>
16. Quail DF, Joyce JA (2017) The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* 31:326–341. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.009>
17. Chen Z, Hambarzumyan D (2018) Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front Immunol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01004>
18. Burnstock G (2007) Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659–797. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>
19. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509:310–317. <https://doi.org/10.1038/nature13085>
20. Allard B, Allard D, Buisseret L, Stagg J (2020) The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 17:611–629. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0382-2>
21. Whiteside TL (2017) Targeting adenosine in cancer immunotherapy: a review of recent progress. *Expert Rev Anticancer Ther* 17:527–535. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1316197>
22. Erices JI, Bizama C, Niechi I, et al (2023) Glioblastoma Microenvironment and Invasiveness: New Insights and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* 24:7047. <https://doi.org/10.3390/ijms24087047>
23. Cappellari AR, Vasques GJ, Bavaresco L, et al (2012) Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion. *Mol Cell Biochem* 359:315–322. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1025-9>
24. Azambuja JH, Gelsleichter NE, Beckenkamp LR, et al (2019) CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. *Mol Neurobiol* 56:3260–3279. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1240-4>
25. Azambuja JH, Schuh RS, Michels LR, et al (2020) Nasal Administration of Cationic Nanoemulsions as CD73-siRNA Delivery System for Glioblastoma Treatment: a New Therapeutical Approach. *Mol Neurobiol* 57:635–649. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01730-6>
26. Gelsleichter NE, Azambuja JH, Rubenich DS, Braganhol E (2023) CD73 in glioblastoma: Where are we now and what are the future directions? *Immunol Lett* 256–257:20–27. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2023.03.005>
27. Fujita M, Scheurer ME, Decker SA, et al (2010) Role of Type 1 IFNs in Antiglioma Immunosurveillance—Using Mouse Studies to Guide Examination of Novel Prognostic Markers in Humans. *Clinical Cancer Research* 16:3409–3419. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0644>
28. Wiesner SM, Decker SA, Larson JD, et al (2009) *De novo* Induction of Genetically Engineered Brain Tumors in Mice Using Plasmid DNA. *Cancer Res* 69:431–439. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1800>
29. Maurer LM, Daley JD, Mukherjee E, et al (2022) BRCA1-Associated RING Domain-1 (BARD1) Loss and GBP1 Expression Enhance Sensitivity to DNA Damage in Ewing Sarcoma. *Cancer Research Communications* 2:220–232. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-21-0047>

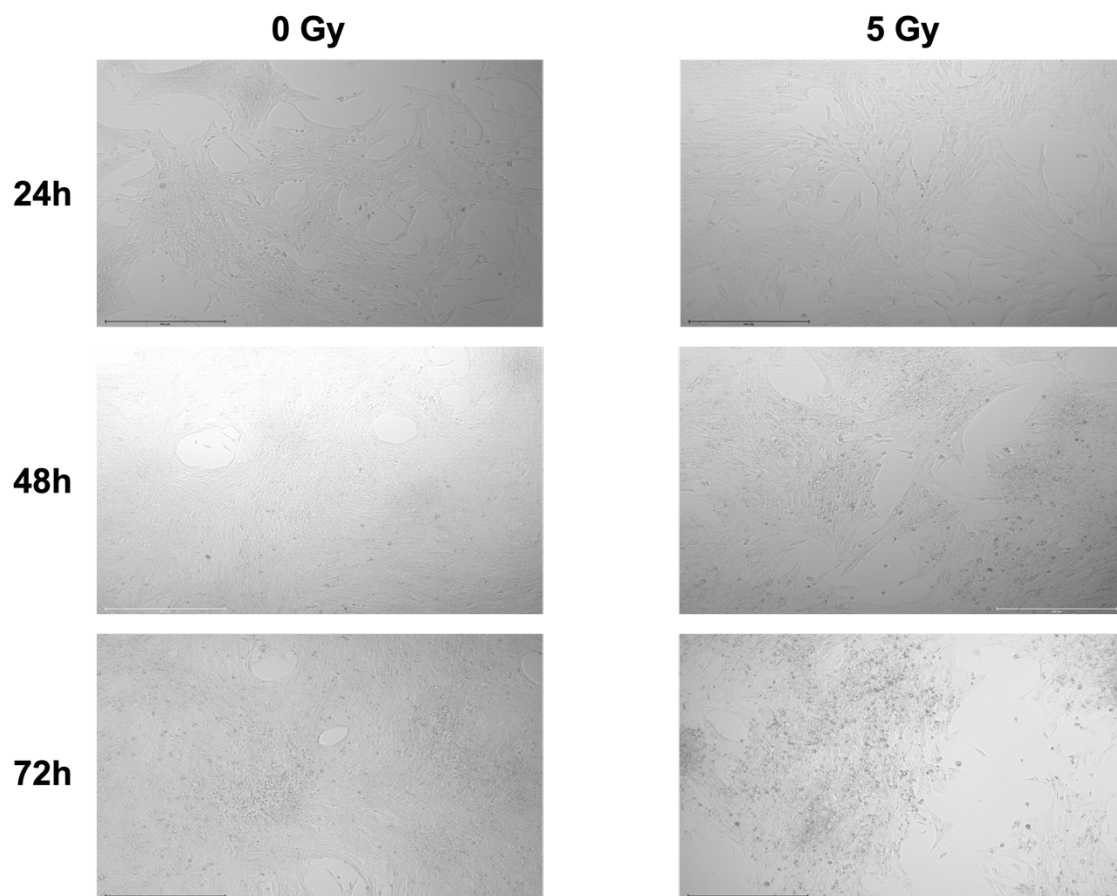
30. Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, et al (2008) The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem* 319:61–68. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9877-3>
31. Azambuja JH, da Silveira EF, de Carvalho TR, et al (2017) Glioma sensitive or chemoresistant to temozolomide differentially modulate macrophage protumor activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861:2652–2662. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.007>
32. Chan K-M, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90640-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90640-8)
33. Bradford M (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
34. Azambuja JH, Ludwig N, Braganhol E, Whiteside TL (2019) Inhibition of the Adenosinergic Pathway in Cancer Rejuvenates Innate and Adaptive Immunity. *Int J Mol Sci* 20:5698. <https://doi.org/10.3390/ijms20225698>
35. Szatmári T, Lumniczky K, Désaknai S, et al (2006) Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci* 97:546–553. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00208.x>
36. Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, et al (2014) Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *J Transl Med* 12:107. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-107>
37. Martínez-Murillo R, Martínez A (2007) Standardization of an orthotopic mouse brain tumor model following transplantation of CT-2A astrocytoma cells. *Histol Histopathol* 22:1309–26. <https://doi.org/10.14670/HH-22.1309>
38. Tschida BR, Largaespada DA, Keng VW (2014) Mouse models of cancer: Sleeping Beauty transposons for insertional mutagenesis screens and reverse genetic studies. *Semin Cell Dev Biol* 27:86–95. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.006>
39. Genoud V, Espinoza FI, Marinari E, et al (2021) Treating ICB-resistant glioma with anti-CD40 and mitotic spindle checkpoint controller BAL101553 (lisavanbulin). *JCI Insight* 6:. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142980>
40. Maeoka R, Ouji Y, Nakazawa T, et al (2023) Local administration of shikonin improved the overall survival in orthotopic murine glioblastoma models with temozolomide resistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 166:115296. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115296>
41. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al (2010) Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
42. Behdad A, Sun X, Khalpey Z, et al (2009) Vascular smooth muscle cell expression of ectonucleotidase CD39 (ENTPD1) is required for neointimal formation in mice. *Purinergic Signal* 5:335–342. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9158-y>

43. Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ (2015) The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer* 15:409–425. <https://doi.org/10.1038/nrc3958>
44. Goswami S, Walle T, Cornish AE, et al (2020) Immune profiling of human tumors identifies CD73 as a combinatorial target in glioblastoma. *Nat Med* 26:39–46. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0694-x>
45. Murao A, Aziz M, Wang H, et al (2021) Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis* 26:152–162. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01663-3>
46. Dosch M, Gerber J, Jebbawi F, Beldi G (2018) Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells. *Int J Mol Sci* 19:1222. <https://doi.org/10.3390/ijms19041222>
47. Bill MA, Srivastava K, Breen C, et al (2017) Dual effects of radiation bystander signaling in urothelial cancer: purinergic-activation of apoptosis attenuates survival of urothelial cancer and normal urothelial cells. *Oncotarget* 8:97331–97343. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21995>
48. Ashrafizadeh M, Farhood B, Eleojo Musa A, et al (2020) Damage-associated molecular patterns in tumor radiotherapy. *Int Immunopharmacol* 86:106761. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106761>
49. Zhu M, Yang M, Zhang J, et al (2021) Immunogenic Cell Death Induction by Ionizing Radiation. *Front Immunol* 12:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705361>
50. Bao X, Xie L (2022) Targeting purinergic pathway to enhance radiotherapy-induced immunogenic cancer cell death. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 41:222. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02430-1>

Supplementary Figures

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
ANTIBODIES		
CD39	Biolegend	143803
CD73	Biolegend	127213
CD73	Cell Signaling	13160
Vinculin	Invitrogen	700062
CHEMICALS		
DMEM- Dulbecco's modified Eagle's medium	Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)	11965092
Trypsin-EDTA 0.05%	Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)	25300054
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Lonza	BW04-479Q
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)	16140071
ECL reagent	Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)	32106
adenosine 5'-(α,β -methylene)diphosphate sodium salt (APCP)	Tocris (Tocris Bioscience, Minneapolis, Minnesota, USA)	3633
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)	89901
HALT Protease and Phosphatase Inhibitor cocktail	Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)	78440
Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels	Biorad (Biorad, Hercules, California, USA)	4561084
0.2 mm nitrocellulose membranes	Biorad (Biorad, Hercules, California, USA)	1620112

Table 1S Materials and Chemicals.



Supplementary Fig. 1 Timeline of cell confluency in irradiated cells and negative control group. Pictures were taken using CT-2A cell line, in 24, 48, 72h timepoints. Scale bar: 500 μm .

ARTIGO CIENTÍFICO 3**Single Cell RNA-sequencing of tumor-associated astrocytes (TAA) from an *in vivo* mouse model reveals a key contribution of reactive astrocytes in Glioblastoma microenvironment**

Gabriela Nogueira Debom¹, Carolina Saibro-Girardi¹, Juliana Hofstatter Azambuja², Saigolalakrishna Yerneni³, Jordana L. Domagalski¹, Marcelo Falchetti⁴, Natã Machado⁴, Paula S. E. Moreira⁴, Edroaldo Lummertz da Rocha⁴, Chaim Sneiderman⁵, Gary Kohanbash^{5*}, Elizandra Braganhol^{1*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Department of Pediatrics, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA.

³Department of Chemical Engineering, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, USA.

⁴Department of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil.

⁵Department of Neurological Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

*Both are corresponding authors

Gary Kohanbash, Ph.D. (gary.kohanbash2@chp.edu)
University of Pittsburgh School of Medicine
4401 Penn Ave - John G. Rangos Sr. Research Center
Zip Code: 15224, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Phone: +1 412 692 9457

Elizandra Braganhol, Ph.D. (ebraganhol@ufcspa.edu.br)
Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA)
Sarmiento Leite, 245 – Main Building – Room 304
Zip code: 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil
Phone: +55 51 3303 8762

Manuscrito em preparação

Abstract

Glioblastoma (GB) stands as the most prevalent and aggressive primary brain tumor among adults. The usual treatment involves tumor resection, radiotherapy, and chemotherapy with temozolomide. However, several patients still present resistance to the standard treatment and the abysmal prognosis remains a challenge, hindering both life quality and a potential cure. This inefficiency may stem from the intricate nature of the GB tumor microenvironment (TME), marked by intense cellular crosstalk between tumor cells and the cells from the tumor surrounding. While the role of myeloid cells in the TME is well-established, the impact of other brain cell populations, such as the glial cells, remains incompletely understood. Astrocytes, pivotal elements in brain physiology, exhibit reactivity as a classical response to brain damage. Although the recent findings have delineated different activation/phenotypes in reactive astrocytes, the exploration of their role in the GB TME is in its early stages. This study aims to investigate how the GB TME influences astrocytes and whether their reactive processes impact tumor progression. Utilizing a syngeneic mouse model for GB generated with the Sleeping Beauty transposon system, replicating human GB biology, astrocytes were isolated through magnetic isolation using ACSA-2. Single-cell RNA sequencing revealed that astrocytes from the tumor niche, termed tumor-associated astrocytes (TAA), express markers associated with relevant inflammatory pathways in GB progression. This research sheds light on the complex interplay between astrocytes and the TME of GB, contributing valuable insights into potential therapeutic avenues.

Keywords

Astrocytes – Glioblastoma – Tumor microenvironment – Single Cell RNA-seq

1. Introduction

Glioblastoma (GB) is the most common and aggressive primary brain tumor in adults [1]. Treatment consists of tumor resection, followed by a combination of radiotherapy and chemotherapy using temozolomide [2]. Even though this tumor has been extensively studied in the past years, several patients still show resistance to the standard treatment, and the devastating prognosis of 12 - 15 months of life continues to represent an obstacle to the life quality and, finally, the cure [3].

The lack of therapy efficiency could be explained by the complexity of the GB tumor microenvironment (TME) [4, 5]. The high aggressiveness of GB is related to the intense crosstalk of cells from the tumor with immune cells such as macrophages recruited to the tumor niche and the resident microglia [6, 7]. Although the role of myeloid cells in TME is already well studied, the impact of other brain cell populations from the tumor surrounding, such as glial cells, is not completely described yet.

Astrocytes are crucial elements of brain physiology, found in a great number in the Central Nervous System (CNS) [8]. The astrocyte reactivity is known as a classical response after damage situations in the brain [9]. In addition to that, recently authors have described that different types of insults could generate a spectrum of activation/phenotypes in reactive astrocytes: the A1 astrocyte (harmful) and the A2 astrocyte (helpful) [10]. However, the exploration of the role of reactive astrocytes in the glioblastoma TME is in its early stages, with limited studies investigating the crucial interplay of these cells in GB progression [11–13].

In this way, the present study aims to investigate how TME of GB affects astrocytes, and if the process of reactivity influences tumor progression. For that, we generated a syngeneic mouse model for GB using the *Sleeping Beauty transposon* system [14, 15]. This genetic model replicates the biology of human GB, arising spontaneously in the brain [16]. To isolate normal astrocytes from tumor cells, we performed a magnetic isolation using ACSA-2 as an astrocytic marker [17, 18]. By using Single-cell RNA sequencing we were able to demonstrate that astrocytes from the tumor niche, named tumor-associated astrocytes (TAA), express markers associated with relevant inflammatory pathways in GB progression.

2. Material and Methods

2.1 Materials

All chemicals and solvents were obtained from standard commercial suppliers with analytical grade standards and were used as received. More information about the chemicals applied in the present study is described in Supplementary Table 1.

2.2 Animals

All animals used in the present study were obtained from The Jackson Laboratory and were handled in the Animal Facility at the University of Pittsburgh per an Institutional Animal Care and Use Committee-approved protocol.

2.2 *Sleeping Beauty* animal model

The procedure was conducted following the literature [14, 19]. The timeline of experimental design is described in Figure 1A. Briefly, 1 - 2 days old C57BL-6j pups (n=10) under hypothermic anesthesia were intracranially injected with plasmids in the intraventricular region (right ventricle) using the coordinates from the skull position of lambda of: 1.5 mm AP ($y = +1.5$ mm), 0.8 mm ML ($x = +0.8$ mm) and 1.5 mm DV ($z = -1.5$ mm). The transfection was performed using the *in vivo*-compatible DNA delivery reagent (*In vivo*-JetPEI™ Polyplus Transfection; Polyplus, catalog nr 101000040). Neonates were injected with a 2 μ L mix of PEI/DNA at a rate N/P = 8, representing 0.5 μ g of DNA, and diluted in 5% D+ Glucose, according to the manufacturer's indications. The injection was performed at a constant ratio of 500 nL/min. The following DNA plasmids were used to induce genetic alterations related to GB: *pT2/C-Luc/PGK-SB13* (Addgene; catalog nr 20207), *pT2/shP53/GFP/mPDGFB*, and *pT/CMV-NRAS* (the last two plasmids generated in the laboratory of Dr. Gary Kohanbash).

After 24h of plasmids injection, the *in vivo* bioluminescence intensity (BLI) measurement was evaluated using an *In Vivo Imaging System* (IVIS) (IVIS Lumina S5™; Perkin-Elmer). Animals received via intraperitoneal 100 μ L of luciferin (substrate for luciferase enzyme; GoldBio, catalog nr LUCK-100) and bioluminescence was measured after 5 minutes. The BLI was performed again on days 16, 30, and 42 when animals reached the endpoint of the experiment, as illustrated in Figure 1B. The endpoint was defined when

animals presented a strong luciferase signal and clinical signals of tumor burden (Figure 1C).

2.3 *Sleeping Beauty* glioblastoma cell line

After 42 days, animals were euthanized, and the brain was collected and dissociated using a Collagenase IV Cocktail containing 32 mg/mL Collagenase IV (Worthington Biochemical Corporation, catalog nr LS0004186), 10 mg/mL DNaseI (Worthington Biochemical Corporation, catalog nr LS002007), and 20 mg Soybean Trypsin Inhibitor (Worthington Biochemical Corporation, catalog nr LS003570). A different cell suspension was obtained from the dissociation of each mouse in separated. Cells were grown in a T75 culture flask containing high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, catalog nr 11965092) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco, catalog nr 16140071), and were kept at 37°C with 95% minimum relative humidity and 5% CO₂ until they reached confluency. The experiments used tumor cells from 1 animal and received the name SBGB (*Sleeping Beauty Glioblastoma*). The appearance of the SBGB cell line under culture conditions is shown in Figure 1E and Figure 1F.

2.4 Intracranial SBGB cell injection

For intracranial tumor cell injections, C57BL/6j mice (n=10, female, 12 weeks old; obtained from The Jackson Laboratory) were anesthetized with isoflurane and injected using a stereotaxic frame. A total of 1×10^4 SBGB cells were resuspended in 2 μ L of sterile DPBS (Lonza, catalog nr BW04-479Q) and injected into the brain of animals using the coordinates from the skull position of bregma of: 1.5 mm AP ($y = +1.5$ mm), 2.5 mm ML ($x = +2.5$ mm) and 3.5 mm DV ($z = -3.5$ mm). Cells were injected at a constant ratio of 500 nL/min to not induce pressure inside the brain.

At day 20 after injection, tumor size was evaluated by BLI measurement. As described in item 2.2, animals were intraperitoneally injected with 100 μ L of luciferin, and bioluminescence was measured after 5 minutes. Subsequently, animals were euthanized and the brain was collected. Samples were collected and divided into experimental groups as follows: tissue from the brain of healthy mice (1), from the non-tumor hemisphere (2), and the tumor and peritumor area (3) (Figure 3A).

2.5 Sample preparation for single-cell analysis

The tissue was processed into a single-cell suspension using mechanical and enzymatic dissociation in a Collagenase IV Cocktail (described in item 2.3). Live cells were isolated using the MACS Dead Cell Removal Kit (Miltenyi Biotec, catalog nr 130-090-101). Three of the samples were further isolated for astrocytes using ACSA-2 microbeads (Miltenyi Biotec, catalog nr 130-097-679). Cell Viability was measured using AOPI (Nexcelom Bioscience, catalog nr NC0285242) and the Auto Cellometer 2000 (Nexcelom Biosciences). Cells were resuspended at a concentration of 1200 cells/ μ L in the FACS buffer (DPBS + 0.04% w/v BSA). Three mice were then pooled at a 1:1:1 ratio prior to loading the samples onto the Chromium machine (10x Genomics). Resuspended cells were loaded onto a Chromium Next GEM Chip K (10x Genomics) and underwent library preparation for GEX libraries using the Chromium Next GEM Single Cell 5' Reagent Kits v2 Chemistry Dual Index (10x Genomics) following manufacturer protocol. Briefly, cells were loaded on the Chromium Next GEM chip K along with Master Mix containing reverse transcription cocktail to obtain cDNA, cDNA then underwent amplification and then GEX library construction. Each step underwent quality control checks using the Agilent high-sensitivity D5000 and an Agilent Tape Station. Libraries were sequenced on NovaSeq PE150 (Illumina) using the following sequencing run cycle: 151+10+10+151. Raw scRNA-seq reads were barcoded-deduplicated and aligned to the mouse reference, mm10 using CellRanger 7.0.1 (10x Genomics).

2.6 Data preprocessing

We started by integrating three gene expression matrices, `expression_matrix_01`, `expression_matrix_02`, and `expression_matrix_03`, using the `cbind` function in R to create a single `expression_matrix`. Next, we created a Seurat object using the `CreateSeuratObject` function from the Seurat package [20]. The parameters for the function were set as follows: the input counts were assigned to the `expression_matrix`, a minimum of three cells (`min.cells = 3`) were required for each gene, and a minimum of 200 features (`min.features = 200`) were required for each cell. We performed data filtering using the `subset` function in Seurat. Cells with fewer than 200 or more than 2500 features were excluded from the analysis. The expression matrix was normalized using the

LogNormalize method with a scale factor of 10000. This was achieved using the NormalizeData function in Seurat. We identified the top 2500 variable features using the FindVariableFeatures function in Seurat. The selection method employed was the variance-stabilizing transformation (VST). The expression data were scaled using the ScaleData function in Seurat. This function normalizes gene expression data for downstream analysis by centering and scaling the expression values. PCA was performed on the variable features using the RunPCA function in Seurat. We generated an elbow plot to visualize the explained variance of the principal components (PCs) and determine the optimal number of PCs to include in the downstream analysis. We identified the neighbors of each cell based on the first eight principal components using the FindNeighbors function in Seurat. We clustered the cells using the FindClusters function in Seurat with a resolution of 0.5. This step allowed us to identify distinct cell populations in the data. Finally, we performed Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) for dimensionality reduction using the RunUMAP function in Seurat. The first eight principal components were used as input dimensions for the UMAP analysis.

2.7 Differential gene expression analysis

After preprocessing, differential expression testing was employed using the Seurat function FindMarkers [20], using Wilcoxon Rank Sum test (test.use = "wilcox"). We considered differentially expressed genes (DEGs) only the ones detected in at least 25% in either of the two populations (min.pct = 0.25), with a minimum 1.2 fold change between groups (logfc.threshold = 0.25), and maximum 0.05 adjusted p-value based on Bonferroni correction (p_val_adj < 0.05). Gene ontology analysis employed the Cluster Profiler function enrichGO to identify the biological processes associated with the clusters' markers [21].

2.8 Statistical analysis

All quantitative data were analyzed using GraphPad Prism software (v10). Values are expressed as individual values. Differences between groups were assessed by one-way ANOVA with *post hoc* analysis when appropriate. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Adult mice transcranially injected with SBGB cells developed glioblastoma tumors after 20 days of the injection

Our first goal was to choose a mouse model to mimic the GB immune characteristics found in human tumors. In this way, we decided to use a genetic murine model based on the *Sleeping Beauty transposon system* to induce mutations in relevant oncogenes related to GB physiopathology. Figure 1 illustrates the timeline of the procedure (1A-C), the neoplastic characteristics in a representative *H&E* of the tumor (1D), and the images of the SBGB cell line under cultured conditions (1E-F).

After the generation of the SBGB cell line and the definition of the tumor cell line characteristics, cells were grown in culture flasks and injected in adult mice to form a GB tumor. The tumor mass growth was checked by BLI measurement and it was possible to note a considerable increase from day 13 to day 20, when the animals were euthanized. The timeline of the SBGB transcranial injection is illustrated in Figure 2A. In Figures 2B and 2C, it is possible to note that animals presented a highly aggressive tumor on day 20, characterized by the presence of necrosis, pseudopalisading, angiogenesis, and mitotic cells (Figures 2B, 2C, and 2E), all those histological characteristics related to GB [22]. Despite tumor presence, animals did not lose weight significantly during the protocol (Figure 2D).

3.2 The TAA phenotype in the TME displays a distinguished transcriptional profile compared to healthy astrocytes, with the overexpression of immune-related genes

Samples were collected from three different conditions: tissue from the brain of healthy mice (1), from the non-tumor hemisphere (2), and from the tumor and peritumor area (3) (Figure 3A). To investigate the impact of astrocytes in the TME all the samples were submitted to enrichment in order to obtain purified astrocytes. We isolated non-transformed astrocytes from tumor cells using magnetic beads associated with the marker ACSA-2 (Figure 3B).

The choice of an alternative astrocytic marker is justified by the genetic proximity of GB tumor cells and astrocytes, culminating in the impossibility of using the usual astrocytic markers, such as GFAP, which is also positive in tumor cells. Studies in the literature utilize ACSA-2 as a marker for astrocyte isolation in mice cultures [23]. Besides that, it

is demonstrated that ACSA-2⁺ astrocytes present co-expression of other astrocytic markers, such as GFAP and GLAST [17]. In addition, our experiments demonstrate that SBGB cells do not show ACSA-2 expression in their cellular membrane (Supplementary Figure S1). For those reasons, ACSA-2 was considered a good astrocytic marker, permitting the efficient sorting of TAA in the tumor samples.

To determine the presence of different phenotypes of astrocytes in the TME, we subsequently analyze the patterns of expression between ACSA-2⁺ cells over the three experimental groups. After performing a single-cell analysis, we generated a UMAP projection of cells from each experimental group, which revealed that TAAs are displayed as a separate population indicating a unique transcriptional profile (Figure 3C-D). We further verified that the cells sampled for scRNA-seq analysis express well-known astrocyte markers like *Slc1a2*, *Ndrg2*, and *Gfap* (Figure 3E). In parallel, markers' transcripts for other brain cell types like microglia, oligodendrocytes, endothelial cells, and immune cells were absent in the dataset (Fig. 3F).

Differential expression analysis comparing the experimental groups provided further details on the differences between TAAs and tumor-independent astrocytes and showed that healthy astrocytes and astrocytes isolated from the non-tumor hemisphere are very similar in terms of molecular signature. In Figure 4A we created a Venn diagram with the comparisons between all three experimental groups, and we found that astrocytes from the TME display 238 upregulated and 118 downregulated marker genes in common on the list of top differentially expressed genes (DEG) compared with both (a) non-tumor astrocytes and (b) healthy astrocytes groups. Genes associated with the healthy status are exemplified by *Ptn*, *Clu*, *Slc1a3*, and *Luzp2*, and with the non-tumor hemisphere were *Dbi* and *Mt1*, for example (Figure 4B). These genes are all known for astrocytic functions in health and disease [9], and were all upregulated in health and non-tumor groups relative to tumor, as shown in the heatmap.

On the other hand, most genes identified as TAA markers were upregulated selectively in the tumor group. This list included classical immune-related genes CxCl2, and IL-1b, but also genes such as *Lyz2* and *Lgals1*, linked to the process of astrocytic reactivity and neuroinflammation in glial cells and neurons [24, 25]. These results lead us to comprehend that astrocytes could participate actively in the TME, once they interact with tumor cells and their released molecules and become reactive, expressing genes for

several other relevant pathways for tumor progression. Therefore, the group comparison between tumor and tumor-independent astrocytes provides evidence that astrocytes in the TME suffer from strong regulation that ultimately leads to the acquisition of a unique astrocyte molecular signature in TAAs.

3.3 Clustering analysis reveals TAA subpopulations

In order to investigate the details of TAA phenotype molecular alterations, we performed clustering analysis and identified 12 clusters with specific transcriptional signatures. Subsequently, we evaluated the UMAP projections containing the discrete cell populations identified from the samples collected in our study. We observed 12 different populations, and we suggest those are different phenotypes of astrocytes. The UMAP with all the different populations is represented in Figure 5A. Figure 5B demonstrates the distribution of the identified clusters according to the experimental groups. Interestingly, among the TAA experimental group, we identified 5 differential clusters: 2, 6, 9, 10, and 12.

After clustering the populations, we performed a test to identify the differential expression of gene markers for each cluster. Figure 5C illustrates the top 25 genes most differentially expressed in cluster 2 according to fold change values and adjusted p-value. In this cluster, found specifically in the tumor samples, the biological pathways associated with the genes are related to synapse pruning/organization, antigen processing, and presentation via MHC-II, and immunoglobulin-mediated immunity, with C1q genes as markers. On the right, in Figure 5D is possible to see the top 25 genes most differentially expressed in cluster 6, and the biological pathways associated with the list of genes include innate immune response and leukocyte migration/adhesion, with Cxcl2 and Ccl4 as markers. The list of the top 25 genes from the remaining clusters is demonstrated in Figure S2 (normal astrocytes, from healthy/non-tumor hemisphere) and Figure S3 (tumor). Together, the results demonstrate a high association with diverse phenotypes of astrocytes not only in the tumor niche but also showing a difference with those genes expressed by astrocytes from a healthy brain.

4. Discussion

Different cell lines derived from murine tumors are intensively used as a useful tool in the preclinical research of GB therapeutics [26]. Although orthotopic models by implantation have been widely utilized, spontaneous tumors can mimic the conditions of human brain tumors [16]. In this way, authors have increasingly turned to models involving genetic modifications of crucial oncogenes, leading to the spontaneous emergence of the tumor. One example of that is the SB28 cell line [19], originating from a C57BL/6 GB tumor, which was created through the *Sleeping Beauty transposon* system [14, 15]. This cell line has garnered growing interest due to its key attributes, serving as an immunocompetent model for GB and enabling research in the field of immunotherapy [27–30]. In the present work, we decided to use a *Sleeping Beauty* cell line - which we named SBGB. Using the SBGB, we were able to better investigate the complexity of TME and the immunomodulatory crosstalk between immune cells and astrocytes.

The study of the astrocytic reactivity in the GB microenvironment is challenging due to the similarities between tumor cells and non-cancerous astrocytes around the tumor mass [18]. In the case of GB, the study of the reactivity process of TAA faces relevant challenges. Cells from GB tumors have similar morphology to astrocytes, and show expression of important astrocytic markers such as the glial fibrillary acidic protein (GFAP), S100 β , AQP4, and ALDH1L1, difficulting a good isolation of these two TME cellular components [18, 31]. In addition, the blood concentration of GFAP is reported as an indicator of GB diagnosis [32].

To overcome this obstacle, astrocytes were isolated using an alternative marker, the ACSA-2, which permits the isolation of astrocytes from tumor cells. SBGB cells do not show ACSA-2 expression in their cellular membrane (Supplementary Figure S1). ACSA-2 is the abbreviation for *astrocyte cell surface antigen-2* and is a commercial antibody from *Miltenyi Biotec* originally developed for astrocyte isolation from both young and adult mice. ACSA-2⁺ astrocytes present co-expression of other astrocytic markers, such as GFAP, S100 β , ALDH1L1, and GLAST, and very interestingly is more broadly expressed on astrocytes than GFAP [17]. Our results demonstrated that the population of ACSA-2⁺ astrocytes in all experimental groups also presented expression of several astrocytic markers, including GLAST (Slc1a3) and GLT-1 (Slc1a2). Additionally, it was not observed expression of markers associated with other cell types, such as microglia and oligodendrocytes.

According to Batiuk and colleagues (2017), labeling and isolation of astrocytes using ACSA-2 as an astrocyte marker is highly efficient showing an elevated rate of purity and viability, in addition to preventing the contamination with other cell types such as neurons, oligodendrocytes, microglia, and endothelial cells. ACSA-2 antibody binds the sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta (ATP1B2) located in the membrane of astrocytes [23]. ATP1B2 is co-localized with the widely described astrocyte marker protein GLT-1, and it is known that reactive astrocytes still show expression of ATP1B2 [23]. Moreover, the efficiency of the ACSA-2 marker allied with Magnetic Beads technology for astrocyte isolation is shown in literature by other studies, corroborating the use of this marker in our experiments [17, 33].

Astrocytes constitute 20 to 40% of all cells in the CNS, and the percentage may reach up to 50% depending on the study [8, 34, 35]. Although highly abundant, indicating a significant role in the CNS, for many years astrocytes were characterized merely as supportive cells for neurons. The advancement of modern imaging methods, molecular genetics, and transcriptomics allowed a more precise description and a deeper understanding of the astrocyte complex functioning, revealing its crucial role in brain physiology [8]. In fact, the variety of differential clusters in the healthy astrocytes experimental group shown by our results demonstrated the potential of astrocytes in several pathways associated with CNS homeostasis. Additionally, we demonstrated that healthy astrocytes and astrocytes isolated from the non-tumor hemisphere are very similar, while astrocytes from the sample collected in the tumor and peritumor region presented a different transcriptional profile.

Classically denominated astrogliosis, the astrocytic reactivity in the face of injuries now has gathered significant attention from several authors who described this process not only as a glial scar formation [9, 36]. The activation of astrocytes diverges according to the nature of the insult, in a spectrum of activation varying from A1 (harmful, related to neuroinflammatory conditions) and A2 (helpful, associated with neuronal regeneration) [10]. However, the investigation into the function of reactive astrocytes in the GB TME is just beginning, with only a few studies delving into the vital interaction of these cells in the progression of GB [11–13]. In our investigation, we demonstrated the impact of the TME on the development of distinct populations of reactive astrocytes in GB. Consistent with existing literature, we observed a correlation between inflammatory pathways and the specific astrocyte's activation patterns. Furthermore, our study represents a pioneering effort in characterizing the activation profiles of astrocytes using

a novel animal model of GB induction with a better representation of the immune environment.

Our data suggests that the close interaction of tumor cells and astrocytes contributes to the reactivity of TAA, which is related to the immunomodulation of TME and GB progression. Our results contribute to the establishment of the role of TAA in brain tumors, demonstrating the adaptive characteristics of astrocytes and the exceptional plasticity of this cell in CNS [37]. In this way, the present study represents an innovative perspective of how GB cells influence astrocytes from the tumor surrounding and the consequences of this crosstalk in immunomodulation of TME.

Author contributions

GND and EB conceived the study. GND, CSG, and JHA contributed to the conception and design of the manuscript. GND, JHA, SY, and JLD performed the experiments, interpreted the results, and constructed the graphics. The sample preparation for Single-cell analysis was performed by CS. GND, CG, MF, NM, PSEM, and ELR executed the bioinformatic data analysis. The first draft was written by GND and CG. GK and EB supervised, discussed the experimental design, and the interpretation of the data, provided financial support to perform the study, supervised the writing of the manuscript and both are the corresponding authors. All authors contributed to the manuscript and approved the submitted version.

Consent for publication

All authors agreed with the content of the manuscript and with the submission.

Conflict of Interest

The authors report no conflict of interest.

Funding

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - 19/2551-0000663-2; 21/ 2551-0000078-3; 22/2551-0000388-5; 22/2551-0000388-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; process number 88881.622753/2021-01), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 312187/2018-1; 400882/2019-1; 400882/2019-1; 315522/2021-6) and Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. GND was supported by CAPES and the University of Pittsburgh. EB was supported by CNPq, CAPES, FAPERGS, and UFCSPA fellowships.

References

1. Nørøxe DS, Poulsen HS, Lassen U (2016) Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open* 1:e000144. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000144>
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al (2005) Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352:987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
3. Dymova MA, Kuligina E V., Richter VA (2021) Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci* 22:6385. <https://doi.org/10.3390/ijms22126385>
4. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, et al (2011) The brain tumor microenvironment. *Glia* 59:1169–1180. <https://doi.org/10.1002/glia.21136>
5. Wu W, Klockow JL, Zhang M, et al (2021) Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacol Res* 171:105780. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105780>
6. Ma J, Chen CC, Li M (2021) Macrophages/Microglia in the Glioblastoma Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 22:5775. <https://doi.org/10.3390/ijms22115775>
7. Lin C, Wang N, Xu C (2023) Glioma-associated microglia/macrophages (GAMs) in glioblastoma: Immune function in the tumor microenvironment and implications for immunotherapy. *Front Immunol* 14:.. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1123853>
8. Khakh BS, Sofroniew M V (2015) Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci* 18:942–952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>
9. Escartin C, Galea E, Lakatos A, et al (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* 24:312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
10. Liddel SA, Barres BA (2017) Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46:957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
11. Brandao M, Simon T, Critchley G, Giamas G (2019) Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment. *Glia* 67:779–790. <https://doi.org/10.1002/glia.23520>
12. Henrik Heiland D, Ravi VM, Behringer SP, et al (2019) Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat Commun* 10:2541. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10493-6>
13. Zhang C, Wang Z, Liu H, et al (2023) Characterization of tumor-associated reactive astrocytes in gliomas by single-cell and bulk tumor sequencing. *Front Neurol* 14:.. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1193844>
14. Wiesner SM, Decker SA, Larson JD, et al (2009) *De novo* Induction of Genetically Engineered Brain Tumors in Mice Using Plasmid DNA. *Cancer Res* 69:431–439. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1800>
15. Tschida BR, Largaespada DA, Keng VW (2014) Mouse models of cancer: Sleeping Beauty transposons for insertional mutagenesis screens and reverse

- genetic studies. *Semin Cell Dev Biol* 27:86–95. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.006>
16. Frederico SC, Zhang X, Hu B, Kohanbash G (2023) Pre-clinical models for evaluating glioma targeted immunotherapies. *Front Immunol* 13:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1092399>
 17. Kantzer CG, Boutin C, Herzig ID, et al (2017) Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes. *Glia* 65:990–1004. <https://doi.org/10.1002/glia.23140>
 18. Galland F, Seady M, Taday J, et al (2019) Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochem Int* 131:104538. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104538>
 19. Haddad AF, Young JS, Amara D, et al (2021) Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies. *Neurooncol Adv* 3:. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdab100>
 20. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, et al (2021) Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 184:3573–3587.e29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.048>
 21. Wu T, Hu E, Xu S, et al (2021) clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation* 2:100141. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>
 22. Mikkelsen VE, Solheim O, Salvesen Ø, Torp SH (2021) The histological representativeness of glioblastoma tissue samples. *Acta Neurochir (Wien)* 163:1911–1920. <https://doi.org/10.1007/s00701-020-04608-y>
 23. Batiuk MY, de Vin F, Duqué SI, et al (2017) An immunoaffinity-based method for isolating ultrapure adult astrocytes based on ATP1B2 targeting by the ACSA-2 antibody. *Journal of Biological Chemistry* 292:8874–8891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765313>
 24. Sirko S, Irmeler M, Gascón S, et al (2015) Astrocyte reactivity after brain injury—: The role of galectins 1 and 3. *Glia* 63:2340–2361. <https://doi.org/10.1002/glia.22898>
 25. Cougnoux A, Yerger JC, Fellmeth M, et al (2020) Toll-like receptor mediated lysozyme expression in Niemann-pick disease, type C1. *Mol Genet Metab* 131:364–366. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.10.009>
 26. Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, et al (2014) Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *J Transl Med* 12:107. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-107>
 27. Murty S, Haile ST, Beinat C, et al (2020) Intravital imaging reveals synergistic effect of CAR T-cells and radiation therapy in a preclinical immunocompetent glioblastoma model. *Oncoimmunology* 9:. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1757360>
 28. Simonds EF, Lu ED, Badillo O, et al (2021) Deep immune profiling reveals targetable mechanisms of immune evasion in immune checkpoint inhibitor-

- refractory glioblastoma. *J Immunother Cancer* 9:e002181. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-002181>
29. Maeoka R, Ouji Y, Nakazawa T, et al (2023) Local administration of shikonin improved the overall survival in orthotopic murine glioblastoma models with temozolomide resistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 166:115296. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115296>
 30. Letchuman V, Ampie L, Shah AH, et al (2022) Syngeneic murine glioblastoma models: reactionary immune changes and immunotherapy intervention outcomes. *Neurosurg Focus* 52:E5. <https://doi.org/10.3171/2021.11.FOCUS21556>
 31. Li D, Liu X, Liu T, et al (2020) Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *Glia* 68:878–897. <https://doi.org/10.1002/glia.23734>
 32. Vietheer J-M, Rieger J, Wagner M, et al (2017) Serum concentrations of glial fibrillary acidic protein (GFAP) do not indicate tumor recurrence in patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 135:193–199. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2565-y>
 33. Holt LM, Olsen ML (2016) Novel Applications of Magnetic Cell Sorting to Analyze Cell-Type Specific Gene and Protein Expression in the Central Nervous System. *PLoS One* 11:e0150290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150290>
 34. Herculano-Houzel S (2014) The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62:1377–1391. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>
 35. Filous AR, Silver J (2016) “Targeting astrocytes in CNS injury and disease: A translational research approach.” *Prog Neurobiol* 144:173–187. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.03.009>
 36. Escartin C, Guillemaud O, Carrillo-de Sauvage M (2019) Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia* 67:2221–2247. <https://doi.org/10.1002/glia.23687>
 37. Verkhratsky A, Nedergaard M (2018) Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* 98:239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>

Legends to Figures:

Figure 1: Development of a glioblastoma cell line using the Sleeping Beauty transposon system. (A) Illustration of the intracranially injection of neonate mice (1 – 2 days old) with DNA plasmids in the intraventricular region. The three DNA plasmids used in the experimental protocol are described in the illustration. (B) Timeline of bioluminescence scanning of mice. (C) Bioluminescence scanning after 10 minutes of luciferin injection. In the figure is shown the results of two timepoints: 24h after DNA plasmids injection, at the day 1, and 42 days after, when the endpoint was defined. (D) Representative *H&E* of tumor demonstrating neoplastic characteristics of cells. Scale bars: 340 μm and 170 μm . (E) Representative image of SBGB cells under culture conditions. Scale bar: 340 μm . (F) SBGB cells expressing GFP marker. Scale bar: 400 μm . Abbreviation: *H&E*: hematoxylin and eosin.

Figure 2: Animals transcranially injected with the SBGB cell line developed significant tumors after 20 days. (A) Illustration of the timeline of SBGB cells injection on adult animals (n=10). (B) Tumor growth indicated by luciferin signal in IVIS. Bioluminescence (BLI) scanning occurred at the days 6, 13 and 20. (C) Representative BLI of mouse on days 13 and 20, demonstrating the size of the tumor. (D) Weight measurement of animals after injection on day 0, until the experiment endpoint. (E) Brain collected from mouse after euthanasia, where is possible to note the tumor size and appearance. Data were analyzed by one-way ANOVA, and Tukey *post-hoc*, and each dot represent an individual. **** $p < 0.0004$ as indicated in the graph. Abbreviation: Sleeping Beauty glioblastoma cells (SBGB).

Figure 3: The TAA phenotype displays a discrete transcriptional profile relative to astrocytes unrelated to the TME. (A) Illustration of experimental groups. Samples were collected from the brain of healthy animals (1), and from animals injected with tumor cells – the hemisphere without tumor (2) and the tumor and peritumor area (3). (B) Tissue and tumor samples were mechanical and enzymatic dissociated and the astrocytes were isolated using ACSA-2 magnetic beads. (C–D) UMAP projection of cells from each experimental group. (E) The cells sampled by scRNA-seq feature astrocyte-like gene expression. (F) Differential expression testing transcripts for other brain cell types like

microglia, oligodendrocytes, endothelial cells, and immune cells. Genes were considered differentially expressed when Bonferroni-adjusted p -value < 0.05 .

TAA: tumor-associated astrocytes; TME: tumor microenvironment; ACSA-2: astrocyte cell surface antigen-2; UMAP: uniform manifold approximation and projection.

Figure 4: Comparison of the expression levels in each experimental group. (A) Overlap of differentially expressed genes in contrasts. In red is represented the overexpressed genes, and in blue the downregulated genes. (B) Differential expression testing comparing each group identified the gene markers for each condition in astrocyte cells. The heatmap displays the top marker genes according to fold change values (scale indicated). Genes were considered differentially expressed when Bonferroni-adjusted p -value < 0.05 .

Figure 5: Clustering analysis reveals TAA subpopulations. (A-B) UMAP projections show the discrete cell populations identified among TAA: clusters 2, 6, 9, 10, and 12. (C-D) Differential expression testing comparing each cluster identified the gene markers for each population. Gene markers and terms linked to clusters 2 and 6 are displayed containing the top marker genes according to fold change values and adjusted p -value (scale indicated) and the biological pathways associated.

Supplementary figure:

Figure S1: Expression of ACSA-2 astrocytic marker in the cellular membrane of SBGB cell line. (A) Representative dot plot of SBGB cells demonstrating the percentage of viable cells in flow cytometry. (B) Representative graphic illustrating the peaks of the control (unstained) (in red) and ACSA-2⁺ SBGB cells (in blue). The absence of peak dislocation between the two experimental groups shows that SBGB does not express the astrocytic marker.

Figure S2: Differential expression testing comparing healthy/non-tumor clusters identified the gene markers for each population. Gene markers are displayed containing

the top marker genes according to fold change values and adjusted p-value (scale indicated) and the biological pathways associated.

Figure S3: Differential expression testing comparing tumor clusters identified the gene markers for each population. Gene markers are displayed containing the top marker genes according to fold change values and adjusted p-value (scale indicated) and the biological pathways associated.

Figures

Figure 1: Development of a glioblastoma cell line using the Sleeping Beauty transposon system.

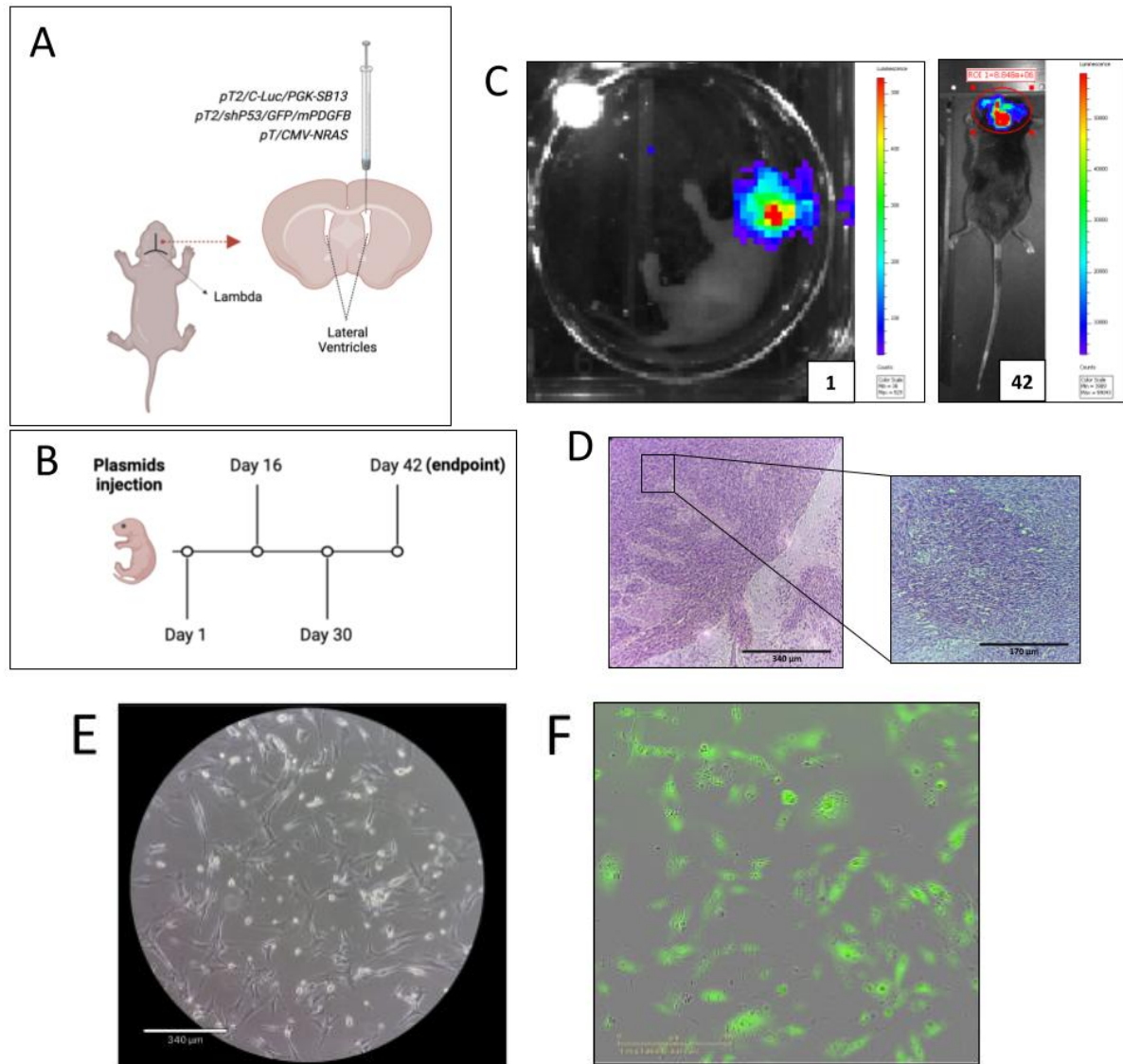


Figure 2: Animals transcranially injected with the SBGB cell line developed significant tumors after 20 days.

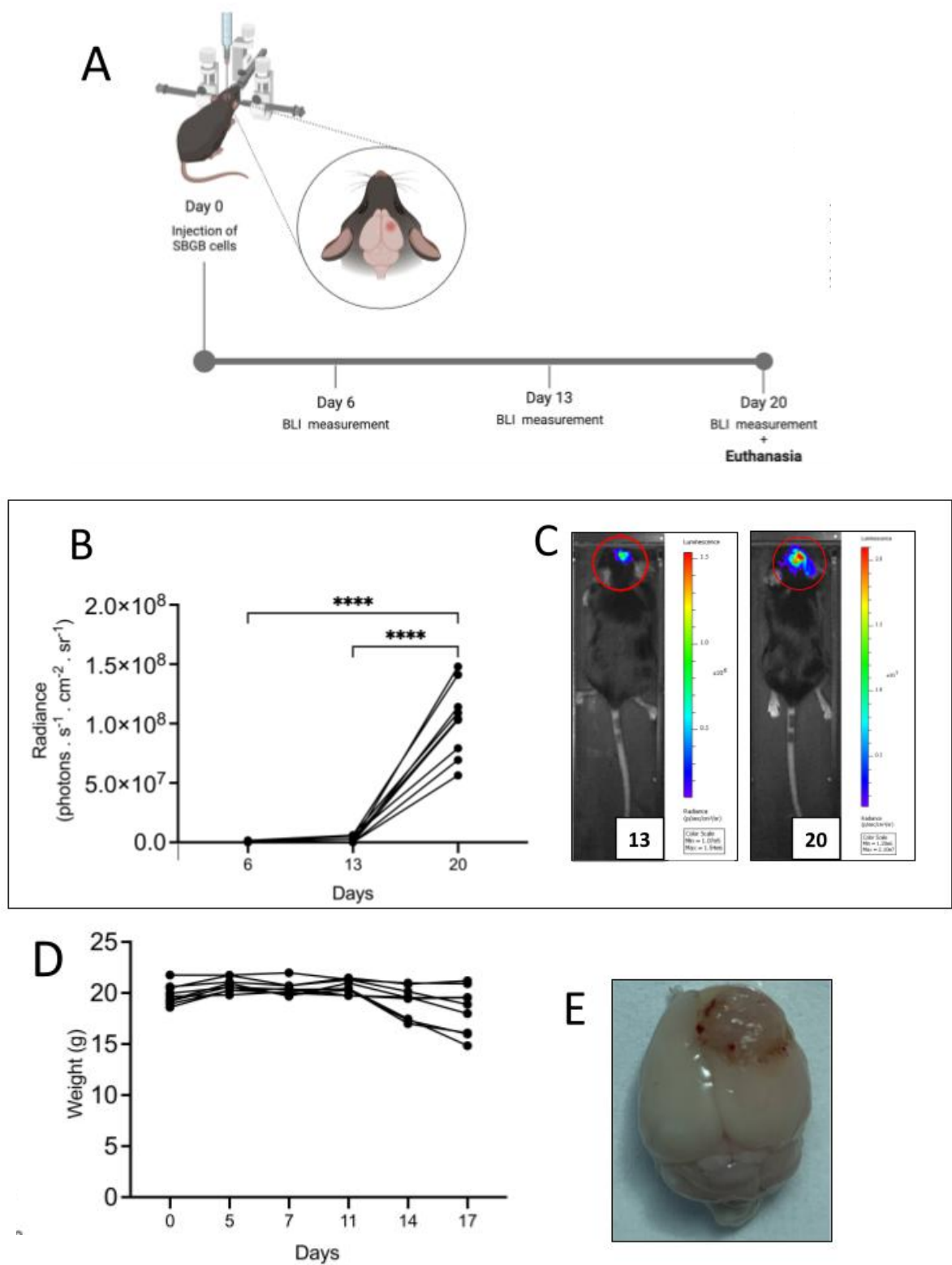


Figure 3: The TAA phenotype displays a discrete transcriptional profile relative to astrocytes unrelated to the TME.

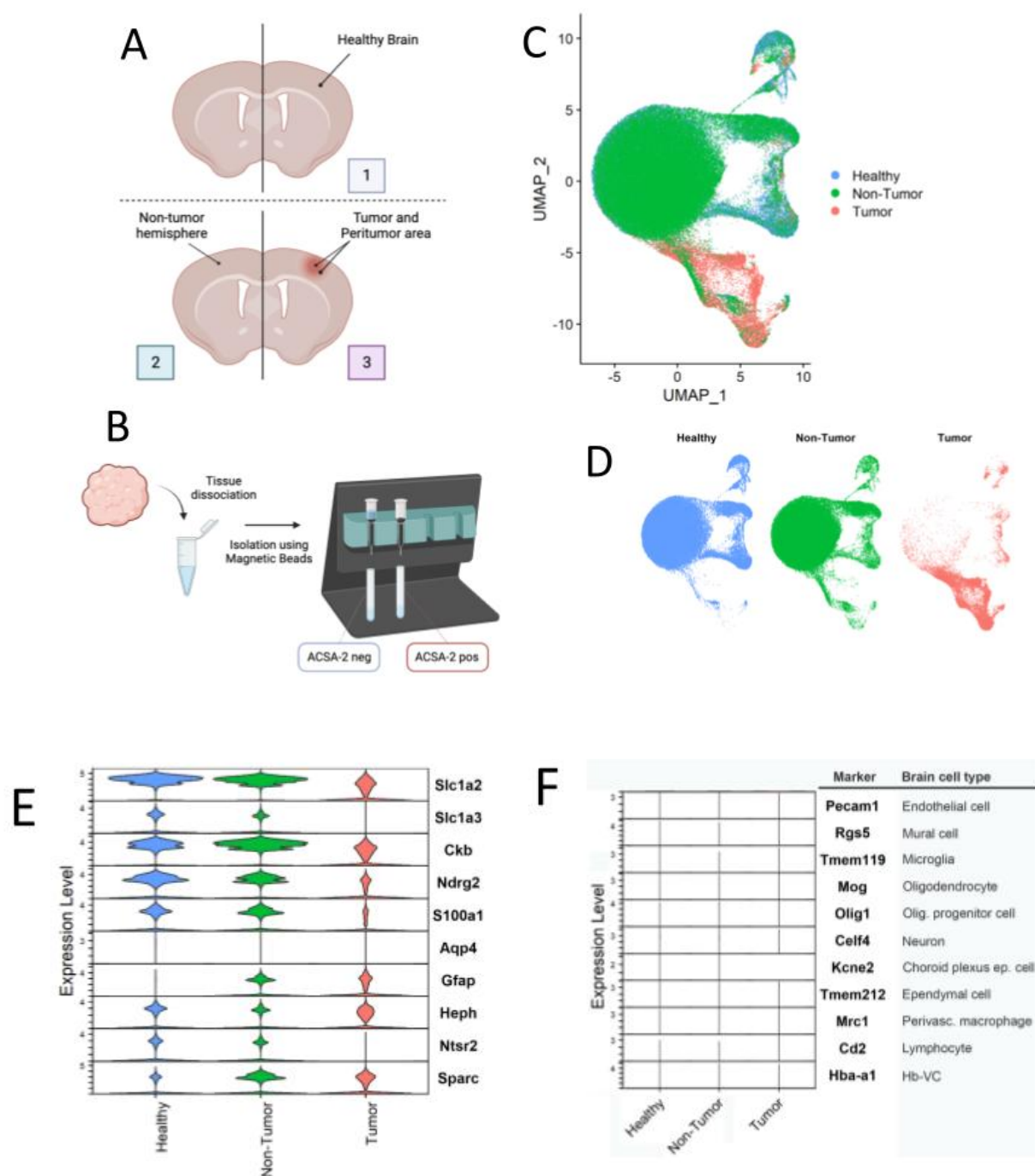


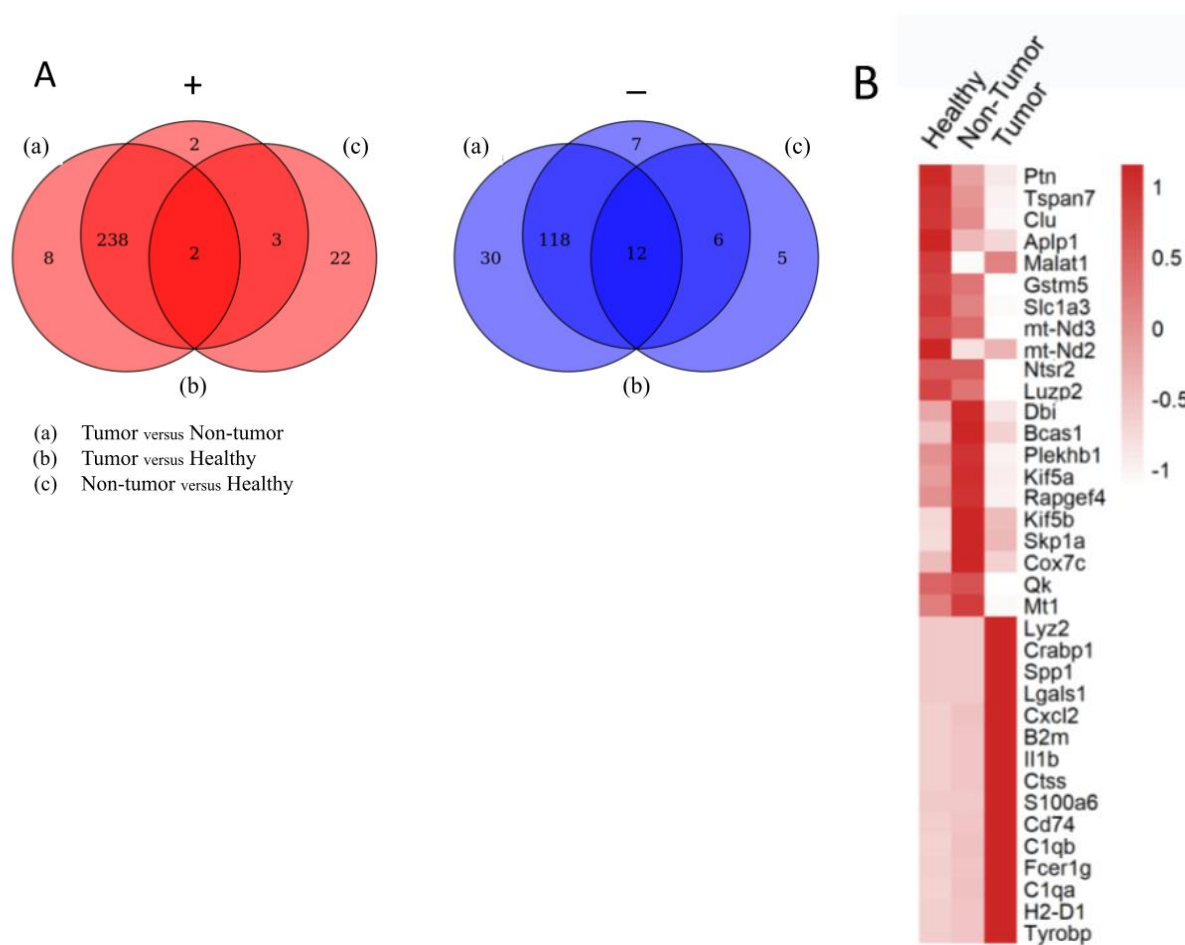
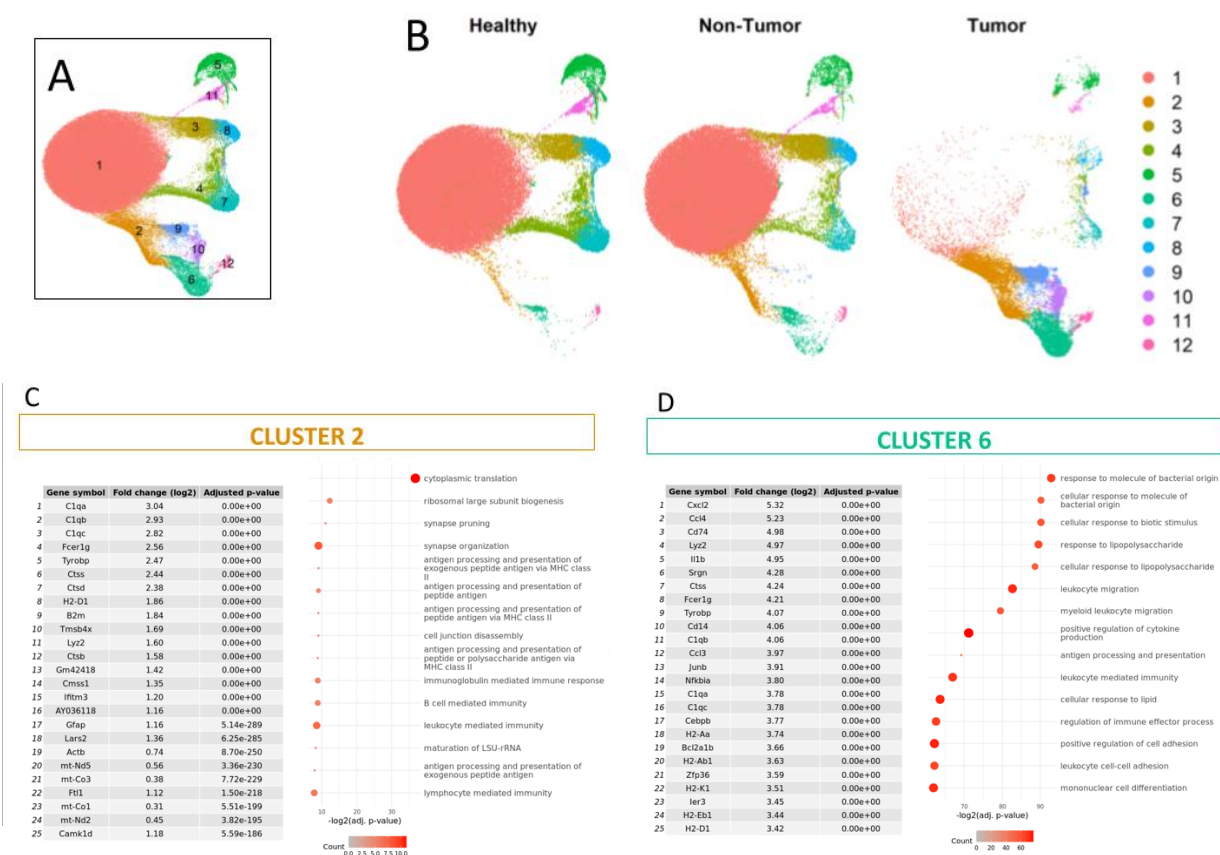
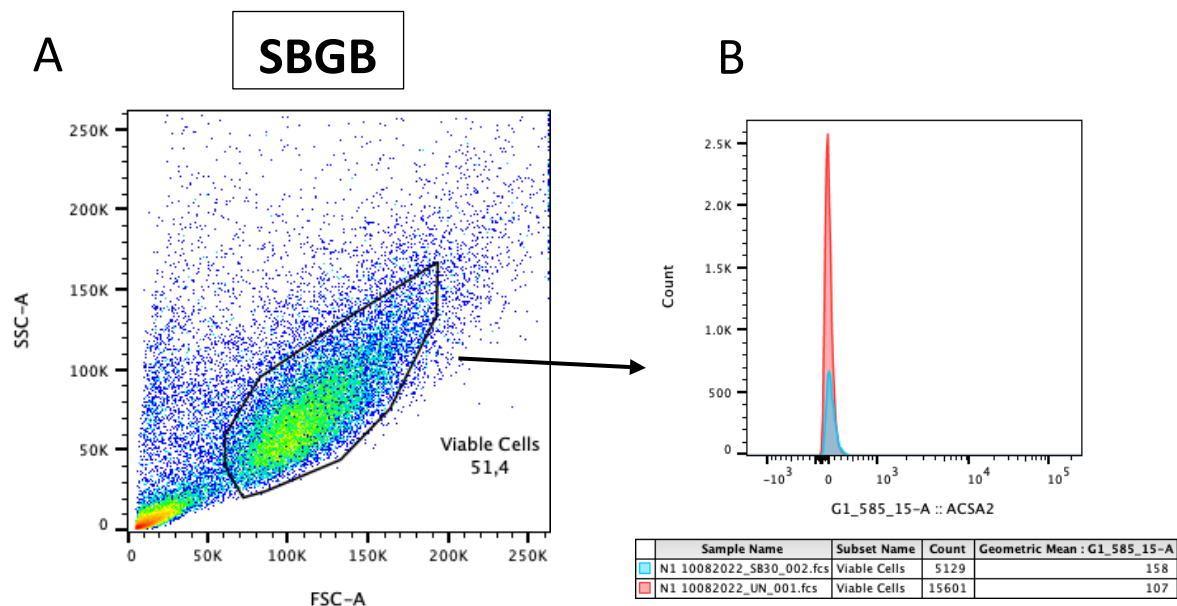
Figure 4: Comparison of the expression levels in each experimental group.

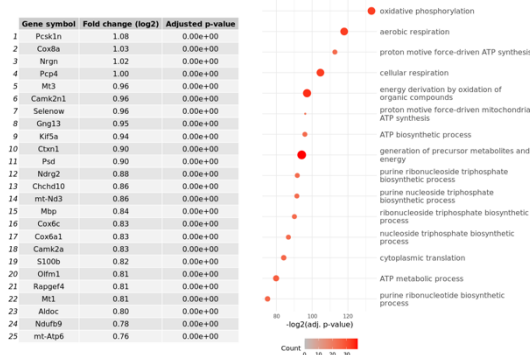
Figure 5: Clustering analysis reveals TAA subpopulations.

Supplementary figure S1: Expression of ACSA-2 astrocytic marker in the cellular membrane of SBGB cell line.

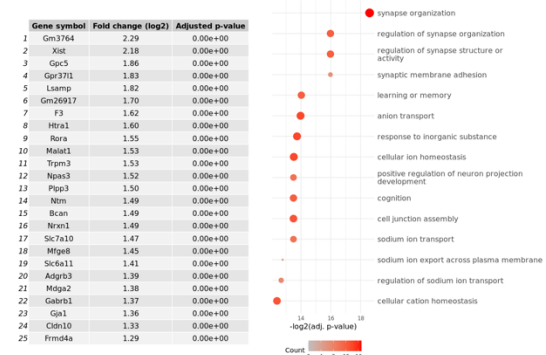


Supplementary figure S2: Differential expression testing comparing healthy/non-tumor clusters identified the gene markers for each population.

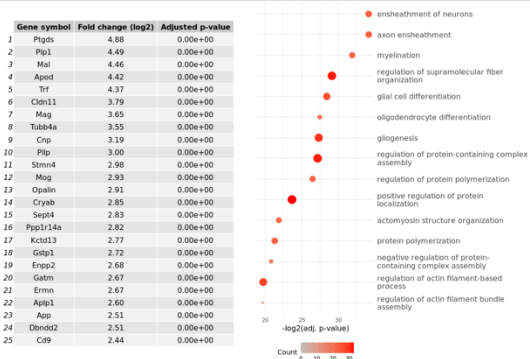
Cluster 1



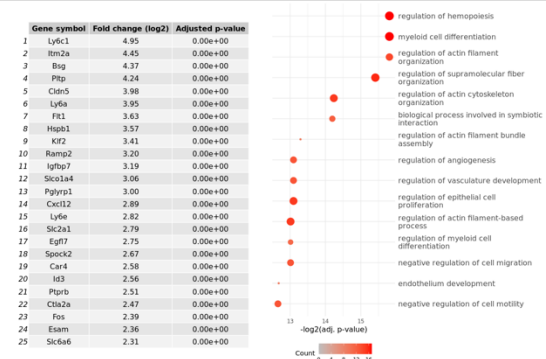
Cluster 3



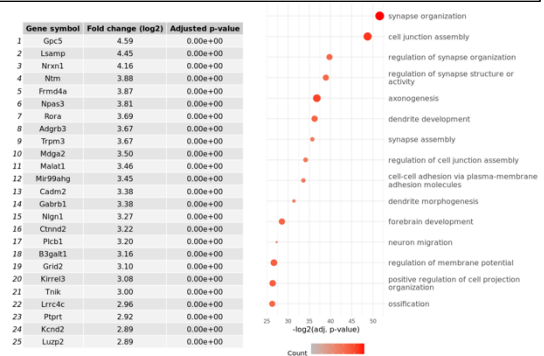
Cluster 5



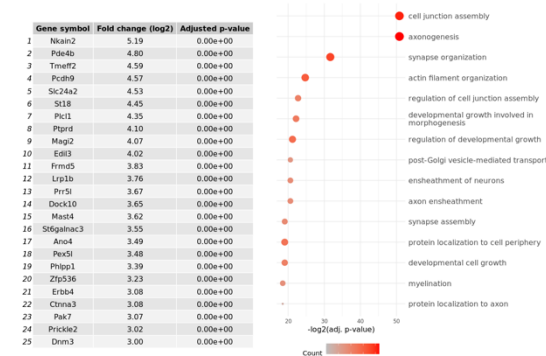
Cluster 7



Cluster 8



Cluster 11



Supplementary figure S3: Differential expression testing comparing tumor clusters
identified the gene markers for each population.

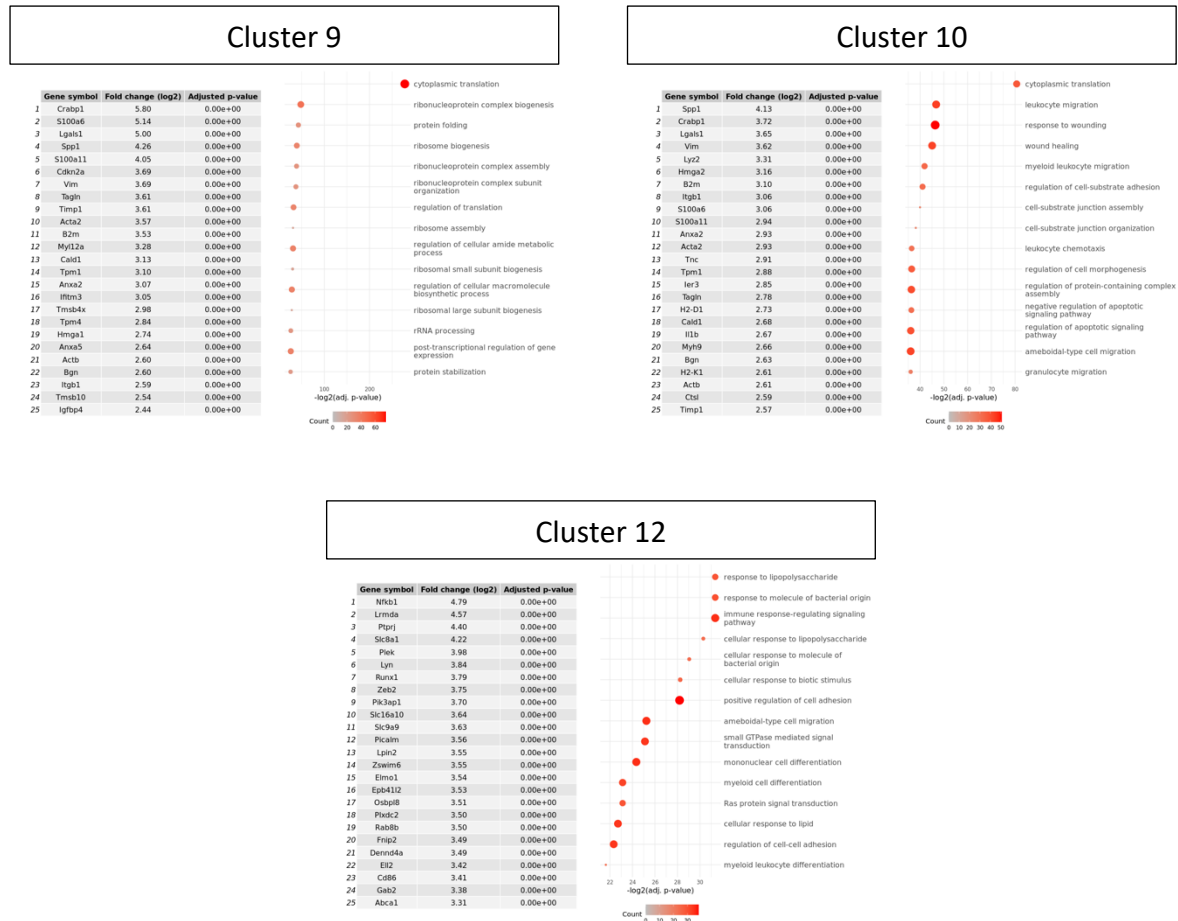


Table 1S. Chemicals

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
CHEMICALS		
DMEM- Dulbecco's modified Eagle's medium	Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)	11965092
Trypsin-EDTA 0.05%	Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)	25300054
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Lonza	BW04-479Q
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)	16140071
D-Luciferin, Potassium Salt	Goldbio (Gold Biotechnology, Saint Louis, Missouri, USA)	LUCK-100
adenosine 5'-(α,β -methylene)diphosphate sodium salt (APCP)	Tocris (Tocris Bioscience, Minneapolis, Minnesota, USA)	3633
<i>In vivo</i> -JetPEI™ Polyplus Transfection	Polyplus	101000040
Collagenase IV	Worthington Biochemical (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA)	LS0004186
DNaseI	Worthington Biochemical (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA)	LS002007
Soybean Trypsin Inhibitor	Worthington Biochemical (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA)	LS003570
MACS Dead Cell Removal Kit	Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Germany)	130-090-101
Anti-ACSA-2 MicroBead Kit, mouse	Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Germany)	130-097-679
AOPI	Nexcelcom Bioscience (Nexcelom Bioscience LLC., Lawrence, Massachusetts, USA)	NC0285242
DNA PLASMIDS		
<i>pT2/C-Luc/PGK-SB13</i>	Addgene	20207
<i>pT2/shP53/GFP/mPDGFB</i>	<i>generated in laboratory</i>	<i>not applied</i>
<i>pT/CMV-NRAS</i>	<i>generated in laboratory</i>	<i>not applied</i>

DISCUSSÃO

Apesar do intenso e incansável trabalho de inúmeros pesquisadores para desvendar a biologia celular e molecular do GB nas últimas décadas, o prognóstico dos pacientes que apresentam este tumor segue sendo devastador. Com uma taxa média de sobrevida de apenas 12 a 15 meses após o diagnóstico, os pacientes enfrentam grandes obstáculos relacionados ao tratamento convencional, fazendo com que o GB seja considerado incurável (37,46). Um dos fatores que influenciam nessa dificuldade terapêutica é o microambiente estabelecido pelos diversos componentes celulares presentes no nicho tumoral, bem como as moléculas liberadas por eles no meio extracelular (49). Este microambiente, chamado de TME, está diretamente relacionado com o favorecimento de condições específicas para o surgimento e a progressão do tumor (47,48).

Especificamente no GB, o intenso *crosstalk* entre os componentes celulares do TME é foco de interesse da comunidade científica, principalmente acerca da relação das células tumorais com as células imunes – a microglia residente e, também, os macrófagos recrutados para o sítio do tumor (49,55). Entretanto, ainda é pouco expressiva a quantidade de estudos que trazem o envolvimento de células gliais no TME de GBs. Portanto, nesta tese, são endereçados os diversos papéis relevantes desenvolvidos por astrócitos no surgimento do tumor, progressão e possível formação de novos focos tumorais.

O astrócito é foco de estudo de alguns autores que buscam descrever o envolvimento dessa célula glial com a tumorigênese, ou seja, os mecanismos que explicam como o astrócito torna-se uma célula neoplásica (84). Apesar de ainda existir controvérsias acerca de qual seria a célula de origem do GB, uma das hipóteses bem aceitas é de que o GB consiste em uma população heterogênea de células derivadas das chamadas células-tronco tumorais, células-tronco com características astrocíticas, identificadas pela presença do marcador astrocitário GFAP (85,86). Estas células-tronco tumorais encontram-se muito presentes na zona subventricular (do inglês, *subventricular zone* - SVZ), que é a maior região germinal no cérebro adulto, localizada entre a camada endodimal dos ventrículos laterais e o parênquima do estriado (86).

O tumor teria sua origem na SVZ e se espalharia em direção ao córtex frontotemporal, com as suas células acumulando mutações gradualmente à medida que

alcançam o córtex (85). Portanto, a SVZ é amplamente considerada como uma potencial fonte de células iniciadoras de glioma. Ainda, astrócitos maduros também podem sofrer desdiferenciação, redirecionando seu transcriptoma para acelerar a proliferação descontrolada característica de uma célula tumoral, provando mais uma vez ser um tipo celular com um terreno fértil para contribuir com o crescimento do GB (VERDUGO; PUERTO; MEDINA, 2022). Entretanto, para além de seu papel como possível fonte de novas células neoplásicas, o astrócito também pode estar relacionado ao estabelecimento das já bem descritas condições de imunossupressão do TME presente no GB, imprescindíveis para se entender a complexidade e agressividade deste tipo de tumor.

Primeiramente, cabe ressaltar que os astrócitos participam da formação da BHE, repousando as porções terminais de suas ramificações nos vasos sanguíneos que também a compõe (12). A desestabilização na organização espacial dos componentes celulares desta barreira, causada pela própria presença da massa do tumor, está relacionada ao surgimento de rompimentos (33,87). O aumento da inflamação e vascularidade também contribuem para o aumento da permeabilidade vascular e para que haja um influxo de células e substâncias da periferia para o SNC (41). Como consequência da perda de integridade da BHE, há o favorecimento da entrada de um conjunto de células imunes oriundas da corrente sanguínea até o local do tumor (88–90).

O infiltrado imune é constituído principalmente de macrófagos, componentes tão numerosos no TME que chegam a constituir cerca de 30 a 50% da massa tumoral total (50,54). Os TAMs são constituídos majoritariamente por macrófagos ativados (95%) e de microglias ativadas, as células imunes residentes do SNC (50). Essa ativação ocorre porque, ao serem recrutados e atingirem o nicho tumoral, os macrófagos acabam interagindo com células tumorais, e a plasticidade fenotípica e funcional de macrófagos durante a ativação permite que essas células assumam diferentes perfis (53).

Em princípio descritos de maneira dicotômica, "ativados de forma clássica" em M1, ou "ativados de forma alternativa", em M2, atualmente essa classificação tem se provado ser mais uma forma de categorização do que o que de fato ocorre no ambiente *in vivo* (53). Os macrófagos M1, induzidos pela exposição a citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ) e TNF- α , fazem parte da ativação clássica, produzindo fatores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), TNF- α , IL-1 β , IL-6, interleucina 12 (IL-12) e interleucina 23 (IL-23), com o potencial de combater as células tumorais (91). Já a polarização M2 seria desencadeada após estímulos anti-inflamatórios, como interleucina 4 (IL-4), IL-10 ou interleucina 13

(IL-13), estes macrófagos possuindo menor citotoxicidade para as células tumorais através da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β e as quimiocinas CCL22 (quimiocina CC ligante 22) e CCL17 (quimiocina CC ligante 17) (92,93). A classificação mais aceita atualmente é de que macrófagos associados ao tumor, os chamados TAMs, dá-se porque estas células assumem não um fenótipo M1 ou M2 genuíno, mas, ao invés disso, provavelmente exibem um *continuum* ou um estado transitório de diferenciação, com a existência de marcadores tanto M1 como M2 nesses macrófagos ativados pelo tumor (53).

Os TAMs são uma população proeminente de células imunológicas do TME de GBs, e por desempenharem um papel crítico na indução da imunossupressão, eles tornam-se alvos relevantes no controle da progressão do tumor (53). Isso é verdade porque os mecanismos para a evasão imune e supressão do TME favorecem o estabelecimento da célula tumoral e a perda da função efetora de células imunes do local ((52,94). Juntamente com os TAMs, a presença de Tregs garante ao GB a fama de ser um “*cold tumor*”, um tumor imunologicamente frio em que não há uma forte resposta de células T efectoras à presença das células tumorais (44). Diante do fato de que o recrutamento de novos TAMs e Tregs para o TME é um fator crucial para o estabelecimento e manutenção de um ambiente imunossupresso, torna-se imprescindível delimitar que a integridade dos astrócitos formadores da BHE seja uma condição fundamental para o crescimento do tumor (95).

Uma vez recrutados, TAMs e astrócitos residentes do SNC podem vir a estabelecer um importante *crosstalk* no sentido de formar novos astrócitos reativos no TME, contribuindo para o aumento do processo de modulação imune (22). Microglia e astrócitos exibem uma íntima comunicação bidirecional, que ocorre através da liberação de uma variedade de moléculas, incluindo citocinas, quimiocinas, ATP e fatores de crescimento (96). A “conversa molecular” entre microglia e astrócitos desempenha um papel importante frente a estímulos estressores. É descrito o potencial que microglias ativadas, usualmente as primeiras células a reagirem frente a um insulto no SNC, têm de estimular a ativação de astrócitos vizinhos a elas (24,96). E o contrário também é verdadeiro: astrócitos também realizam esse *crosstalk*, contribuindo para a ativação da microglia (96).

Mais especificamente, a administração de lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina presente na parede celular de bactérias gram-negativas e amplamente utilizada em modelos de neuroinflamação, é capaz de sensibilizar Toll-like receptor 4 (TLR4) da

membrana de microglia, ativando-as (24). A microglia ativada possui a capacidade de “conversar” com astrócitos e ativá-los também, sendo a liberação de interleucina-1 α (IL-1 α), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e componente do complemento 1q (C1q) pela microglia capaz de induzir a ativação de astrócitos para um fenótipo inflamatório do tipo-A1 (24,97). Astrócitos A1 perdem a capacidade de realizar suas funções normais, não funcionando mais como promotores de sobrevivência neuronal, mas sim produzindo mais fatores inflamatórios, como componentes do complemento e citocinas pró-inflamatórias, responsáveis por criar um ambiente tóxico para neurônios e oligodendrócitos (24).

Autores também já demonstraram que a liberação de NO e TNF- α pela microglia ativada também é capaz de levar ao aumento da produção dessas mesmas moléculas agora por astrócitos ativados (98). Já astrócitos com fenótipo reativo podem influenciar a ativação de microglias através da liberação do fator do complemento 3 (C3), que por sua vez regula a atividade fagocitária da microglia (99). Todos estes efeitos pró-inflamatórios da comunicação entre microglia e astrócitos ativados já foram descritos em modelos animais de neuroinflamação, neurodegeneração e até relacionados ao envelhecimento natural do SNC (24,97,100,101).

A “habilidade” do astrócito de tornar-se reativo frente a injúrias pode também ser uma interessante ferramenta para o tratamento de tumores cerebrais. Diversos fatores envolvidos na comunicação cruzada entre microglia, astrócitos e células tumorais já foram descritos da literatura (59). Por exemplo, os altos níveis de IL-6 encontrados no TME do GB são fruto de microglia ativada, entretanto elas não são as únicas fontes produtoras desse mediador: astrócitos ativados também produzem IL-6, citocina que contribui para a migração e invasão do tumor através da liberação de metaloproteinase 14 (MMP14) por células tumorais (102).

Ademais, estudos mostram que as células tumorais podem manipular o comportamento de astrócitos, através da liberação de IL-10 e interferon beta (IFN- β), ativando-os para um fenótipo anti-inflamatório (do tipo-A2) (57). A interação entre astrócitos e microglia também é descrita como crucial para que haja a liberação dos mediadores anti-inflamatórios IL-10, TGF β e Fator estimulante de colônia (CSF), responsáveis por estabelecer a imunossupressão característica do TME (54). Esses resultados indicam que este subtipo distinto de astrócito reativo é mediado por uma alteração conjunta do secretoma circundante causado tanto pela comunicação com células tumorais e microglia, e que somente na presença deles, altas concentrações de IL10 anti-inflamatória e TGF β são detectáveis no TME (54).

O processo de reatividade astrocítica também já foi associado à diminuição da eficiência da quimioterapia por meio da inibição da apoptose induzida por agentes quimioterápicos (59,98). A expressão de genes associados à astrócitos ativados foi considerada marcador de baixo prognóstico para pacientes diagnosticados com GB, segundo o banco de dados do TCGA (Atlas do Genoma do Câncer – do inglês, *The Cancer Genome Atlas*) (103). Além disso, o GB estabelece contato direto com astrócitos/células microgliais por meio de vesículas extracelulares (EVs) (104). As EVs podem transportar moléculas importantes, como miRNAs e citocinas, que tornarão os astrócitos mais reativos e, ao mesmo tempo, induzirão neles um fenótipo A2, semelhante ao M2 nas células microgliais e também chamado por alguns autores de *tumor-enhancing phenotype* (105,106).

Ainda que alguns autores se refiram ao astrócito reativo associado ao tumor como sendo A2, assim como o que ocorre com a classificação de macrófagos e microglia, o fenótipo A2 dos astrócitos ainda não está claramente definido, e os resultados presentes na literatura apontam para um intenso debate em relação à nomenclatura e às funções desses estados reativos (21). Dessa forma, assim como também amplamente discutido na literatura, nesta tese sugere-se que o fenótipo reativo associado ao tumor seja do "tipo-A2", demonstrando múltiplos estágios reativos diferentes, como um reflexo da complexidade do TME (54).

O TME apresenta um importante acúmulo de ATP e de adenosina, em níveis singularmente altos, sendo a adenosina a molécula determinante para a indução de imunossupressão característica no ambiente tumoral do GB (63,68,107). A elevada concentração de adenosina no TME de GBs é responsável por estimular a proliferação celular, angiogênese e o escape da imunovigilância, que é capacidade do sistema imune de reconhecer e inibir o processo neoplásico (65). De fato, dados do nosso grupo de pesquisa demonstram que a adenosina é capaz de induzir a proliferação celular por meio da sensibilização dos receptores A1, além de estimular os processos de migração e invasão celular de GB por meio do aumento da expressão de metaloproteinase 2 (MMP2) e de vimentina (68). Nesse sentido, o primeiro objetivo do nosso trabalho foi realizar uma pesquisa na literatura científica a fim de avaliar os mecanismos pelos quais a sinalização purinérgica é capaz de influenciar o processo de reatividade do astrócito, levando-o a adquirir diferente tipos de fenótipo – associados a processos neuroinflamatórios (tipo-A1) e/ou a processos regenerativos (tipo-A2).

No meio extracelular, o ATP é considerado um DAMP, liberado por células lesionadas durante a inflamação (108). O ATP pode ser liberado por astrócitos através de vias específicas e reguladas, sendo elas a exocitose (109), a liberação vesicular (110) ou a difusão através de canais iônicos (111,112). Além disso, diversos estudos descrevem a presença de receptores e enzimas purinérgicas em astrócitos, garantindo que essas células possuem método de controle de liberação e também de regulação na concentração de mediadores purinérgicos no meio extracelular (68,80–83).

O ATP também possui papel fundamental como um gliotransmissor excitatório, liberado pelos astrócitos na chamada sinapse multipartita (113). Mais detalhadamente, astrócitos participam ativamente de sinapses juntamente de neurônios, liberando moléculas transmissoras – que por serem liberadas por células gliais, recebem não o nome de neurotransmissores, mas de gliotransmissores. Dentre os exemplos de gliotransmissores estão o glutamato, a D-serina e o ATP, e é através da sinalização mediada por eles que o astrócito exerce ações de feedback neuronal e eventualmente modula a transmissão e plasticidade sináptica importantes para os eventos de aprendizado e memória, por exemplo (81).

O ATP pode ser rapidamente convertido em seu produto de metabolização, a adenosina, por meio da atividade das ectonucleotidases. O astrócito expressa majoritariamente a NTPDase2, ectonucleotidase capaz de hidrolisar preferencialmente o ATP em detrimento do ADP em uma relação 30:1 e, subsequentemente, ADP em AMP (83,114,115). Uma vez que altos níveis de ATP extracelular induzem toxicidade para o SNC, sugere-se que a atividade da NTPDase2 em astrócitos pode ser uma importante ferramenta do astrócito a fim de proteger os neurônios contra possíveis danos (114). Astrócitos reativos são também uma fonte proeminente da enzima CD73 em modelo animal de esclerose múltipla através da indução de encefalomielite autoimune experimental (EAE), demonstrando uma superexpressão na enzima como um possível repertório no sentido de proteção durante situações inflamatórias agudas (116). Nesse sentido, a expressão do eixo CD39/CD73 em astrócitos torna-se um importante alvo em patologias envolvendo vias de regulação imune, como por exemplo os tumores cerebrais.

É também possível sugerir que a expressão de receptores purinérgicos possa modular o perfil de ativação de astrócitos, estabelecendo diferentes fenótipos de astrócitos reativos. Segundo o observado na revisão da literatura apresentada nesta tese, a sensibilização dos receptores P1, ou seja, receptores de adenosina, do subtipo A1 (A1R) e do subtipo A2B (A2BR) em astrócitos é crucial para a manutenção da

viabilidade/funcionalidade neuronal e pode contribuir para o perfil A2/neuroprotetor dos astrócitos por mediar ações de neuroproteção via ativação da cascata do fator nuclear kappa B (NFκB) (117,118). Em contraste, a superexpressão do receptor P1 do subtipo A2A (A2AR) perturba a homeostase adenosinérgica e está envolvida na degeneração neuronal, representando uma condição clássica de ativação A1/neurotóxica em astrócitos, promovendo a ativação de microglia/toxicidade neuronal por liberação excessiva de glutamato (119).

Em geral, a adenosina extracelular está diretamente relacionada a processos celulares como viabilidade e adaptabilidade, porém em condições patológicas o aumento na concentração desse mediador purinérgico pode estar associado ao desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas e, também, de tumores cerebrais (107,120). No caso do GB, sabe-se que há um desequilíbrio no eixo CD39-CD73, marcado por uma superexpressão da enzima CD73 nas células tumorais, que leva ao acúmulo de adenosina no meio extracelular (68). Como anteriormente demonstrado por nosso grupo de pesquisa, o silenciamento ou a inibição farmacológica da CD73 utilizando o APCP é capaz de diminuir o crescimento do GB *in vitro* e *in vivo*, sendo a sinalização adenosinérgica um alvo interessante para o tratamento deste tumor cerebral tão desafiador.

O presente trabalho sugere que o uso da CD73 como alvo terapêutico possa ser interessante porque busca modular a expressão dessa enzima em todas as células presentes no TME: não só células tumorais, mas também nas células imunes de fenótipo imunossupressor e nos astrócitos associados ao tumor. Nesse sentido, a revisão de literatura levanta a hipótese de que os astrócitos reativos estão envolvidos na progressão de tumores cerebrais, como o GB. Subsequentemente, eles podem ser corrompidos por células tumorais e participar direta e indiretamente da formação de um microambiente promotor de suporte tumoral, assumindo um perfil ativado tipo A2, caracterizado pela expressão de marcadores específicos para este fenótipo, dentre eles a proteína *S100 calcium-binding protein A10* (S100a10), e pela produção dos mediadores anti-inflamatórios IL-10, IFN-β, TGFβ e CSF, contribuindo para a imunossupressão do TME e, por fim, para o desenvolvimento de radio-quimioresistência características do GB.

Alterações na sinalização purinérgica, incluindo a diminuição da hidrólise do ATP e o aumento da formação de adenosina pelas células tumorais quando comparadas aos astrócitos contribuem para o aumento dos níveis de ATP e de adenosina no TME (83,121). Somado a isso, a modificação da expressão e da funcionalidade dos receptores

purinérgicos, como o P2X7 e os receptores P1 para adenosina, constitui componente importante de desenvolvimento de resistência ao tratamento (68,122,123). Assim, considerando o uso significativo da radioterapia no tratamento do GB e a relação com o nível de ATP liberado de células necróticas no local do tumor, o qual pode servir de substrato para a formação de adenosina no TME, nós nos questionamos o quanto o bloqueio farmacológico da CD73 e a consequente diminuição de formação de adenosina poderia potencializar o efeito da radioterapia. Essa questão foi então investigada no Capítulo 2 desta tese.

De fato, a radioterapia continua sendo um dos pilares de tratamento para o GB (48). Modalidade terapêutica clinicamente bem-sucedida e eficaz para o GB (124,125), a radioterapia é caracterizada pelo uso de radiação ionizante (RI) no local do tumor, causando efeitos citotóxicos ao perturbar a integridade do DNA (126). A radioterapia tem um papel bem estabelecido na melhoria da sobrevivência do paciente e no controle de sintomas (48,127). Infelizmente, o uso de RI contra as células tumorais enfrenta a complexidade do TME, e fatores como modificações na vasculatura e a presença de hipóxia no nicho tumoral estão associados a uma alta incidência de radiorresistência (128). Dessa forma, tornou-se evidente a necessidade de terapia adjuvante para potencializar o impacto da radioterapia em pacientes com GB, logo, o segundo objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos da inibição de CD73 combinada com RI na produção de ATP e adenosina em linhagens de células de GB.

Inicialmente, realizamos a análise da expressão das ectonucleotidases CD39-CD73, as quais são caracterizadas como um importante eixo de conversão de ATP até adenosina no meio extracelular, nas três linhagens de GB utilizadas no estudo. Interessantemente, as linhagens estudadas apresentaram diferentes graus de sensibilidade frente à irradiação (SBGB < GL261 < CT-2A). Todas as três linhagens celulares escolhidas para o presente estudo são derivadas de camundongos C57BL-6. Embora GL261 e CT-2A sejam linhagens de células de glioma de camundongo clássicas e completamente caracterizadas (129,130), as diferentes alterações genéticas dessas duas linhagens celulares explicam a variabilidade encontrada nos níveis de CD39 e CD73 em condições basais. GL261 histologicamente se assemelha a tumores classificados como ependimoblastomas, no entanto essa linhagem celular apresenta mutações genética similares ao GB, como as relacionadas ao oncogene K-ras e no gene supressor de tumor p53 (129). Em contraste com isso, os tumores de CT-2A são descritos pela alta semelhança com células-tronco neurais, histologicamente exibindo um fenótipo próximo

à classificação de astrocitoma de alto grau, e apresentando marcação positiva para p53, GFAP, Sox9 e Sox10 (131). O SBGB é uma linhagem celular gerada usando o sistema de *transposon Sleeping Beauty*. Recentemente, este modelo genético tem sido utilizado para experimentos *in vitro* e *in vivo* relacionados à resistência à quimioterapia e terapias de checkpoints imunológicos para GB (132,133). No presente trabalho, foram utilizados *transposons* para NRAS, p53 e PDGFB, todos oncogenes/repressores tumorais relevantes relacionados à fisiopatologia do GB (134).

Observamos que na linhagem CT-2A a expressão de CD39 encontrou-se próxima a nula, enquanto a expressão de CD73 sofreu um relativo aumento, apesar de não significativo. Tais dados estão alinhados com estudos prévios do grupo que demonstram uma inversão no metabolismo do ATP em células tumorais quando comparadas as células não transformadas, como os astrócitos. Também é importante destacar que esse é o primeiro estudo que caracteriza a expressão em nível de proteína do eixo CD39-CD73 nessas linhagens tumorais.

Além disso, foi demonstrado que células de uma linhagem de GB (CT-2A) após exposição à radioterapia apresentaram uma taxa de crescimento mais lenta. Esse fenômeno foi significativamente potencializado após o tratamento com APCP, sugerindo um efeito concomitante de 5 Gy de radiação e inibição de CD73. Esse efeito muito interessante poderia ser explicado pela presença de altos níveis de ATP derivados da exposição à RI. O ATP tem um papel bem descrito no ambiente extracelular como um DAMP, sendo responsável por sinalizar um alarme para o sistema imunológico (135). Estudos na literatura descrevem o aumento nos níveis de ATP extracelular após exposição à RI como um potencial mediador de toxicidade (136). Nesse sentido, vários autores têm sugerido o uso potencial de certos níveis de radioterapia para melhorar a eficácia da imunoterapia, utilizando o ATP liberado desencadeador de respostas imunes antitumorais no TME (137–139).

Diante do exposto, é possível observar que os dados apresentados levam ao entendimento de que a RI aumenta a liberação de ATP no nicho extracelular, e o efeito concomitante da inibição de CD73 combinada com irradiação é capaz de suprimir o crescimento tumoral por meio da redução da formação de adenosina a partir da hidrólise do ATP. Estes resultados contribuem para melhorar o efeito antitumoral da radioterapia, lançando luz sobre uma via alternativa usando a inibição de CD73 como terapia adjuvante à usualmente utilizada pela clínica. Entretanto, experimentos adicionais para melhor compreender os mecanismos envolvidos na potencialização do efeito citotóxico da RI

promovida pela inibição da CD73 são necessários e estão descritos na sessão “Perspectivas” desta tese.

O terceiro capítulo desta tese objetivou investigar como o TME do GB afeta os astrócitos, e se o processo de reatividade influencia a progressão do tumor. Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado em investigar o papel das células não transformadas na progressão tumoral. Nesse contexto, cabe salientar que o GB é um tumor altamente heterogêneo, estando inserido em um microambiente único, o SNC (140). Apesar das células gliais, particularmente os astrócitos, serem as células mais abundantes do SNC (10) estando presentes no TME desde o princípio da tumorigênese, pouco se sabe a respeito da sua participação na malignidade dos GBs.

De fato, o estudo da reatividade de astrócitos relacionada ao microambiente de tumores cerebrais é demasiadamente desafiadora, uma vez que células gliais (como os astrócitos) e células do tumor muitas vezes apresentam expressão gênica, como GFAP, vimentina e nestina (20), e características morfológicas semelhantes entre si, dificultando a diferenciação da população de células tumorais da população astrocítica (141). Além disso, os níveis circulatórios de GFAP são relatados como potencial indicador de diagnóstico de GB (142).

Consistente com a complexidade funcional apresentada pelos astrócitos, Liddelow e colaboradores propuseram um modelo de polarização astrocítica, no qual os astrócitos podem apresentar um espectro de polarização tendo como extremos o fenótipo A1 (proinflamatório/neurotóxico) e o fenótipo A2 (antiinflamatório/neuroprotetor) (24). Novamente, estudos na área de doenças neurodegenerativas tem caracterizado a participação dos astrócitos A1 na progressão da Doença de Parkinson e da Doença de Alzheimer (22,24,97,100,101) enquanto, paralelamente, há poucos estudos que abordam o papel dos astrócitos na fisiopatologia de tumores do SNC (59,98).

A nossa hipótese é a de que as células tumorais educam os astrócitos a assumir um fenótipo tipo-A2, os quais por meio da produção de fatores de imunossupressão e de indutores pró-tumorais, como a adenosina, promovem a progressão tumoral e o desenvolvimento de radio-quimioresistência. Para comprovar essa suposição, primeiramente desenvolvemos uma linhagem celular de GB utilizando um sistema de *transposons* chamado *Sleeping Beauty*. Este método consiste em induzir tumores cerebrais espontâneos em camundongos através da injeção intracraniana de vetores de *transposon* que expressam um gene de interesse (143,144). Recentemente, este modelo genético tem sido utilizado para experimentos *in vitro* e *in vivo* relacionados à

investigação de mecanismos de resistência à quimioterapia e terapias de checkpoint imunológico para GB (132,133,145).

No presente trabalho, foi estabelecida a linhagem denominada por nós como SBGB (*Sleeping Beauty Glioblastoma*). Para tal, foram utilizados *transposons* para os genes da proteína NRAS, p53 e subunidade B do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFB, do inglês, *platelet derived growth factor subunit B*), relevantes oncogenes/genes supressores de tumor relacionados à fisiopatologia do GB (134). A escolha por utilizar essa linhagem celular tem como objetivo mimetizar as alterações moleculares de tumores de pacientes, mas além disso permite com que o tumor seja formado espontaneamente, aumentando a similaridade com o que ocorre nos pacientes. Ademais, vale destacar que essa tecnologia permite recriar também um ambiente bastante parecido com o TME de GBs humanos, com a complexidade do infiltrado imune característico, vantagem que é amplamente descrita em outros trabalhos da literatura que também utilizam o modelo animal baseado no sistema de *transposons Sleeping Beauty* (146). Dessa forma, foi possível compreender melhor como a comunicação entre células tumorais, infiltrado imune e astrócitos ocorre, de forma a estabelecer como as relações entre esses três pilares fortalecem a progressão do GB.

O procedimento foi conduzido segundo a literatura (143,146). Resumidamente, filhotes de C57BL-6j com 1 a 2 dias de idade (n=10), sob anestesia hipotérmica, foram injetados intracranialmente com plasmídeos na região intraventricular. A transfecção foi realizada utilizando o reagente de entrega de DNA compatível com experimentos *in vivo*. Os seguintes plasmídeos de DNA foram utilizados para induzir alterações genéticas relacionadas ao GB: pT2/C-Luc/PGK-SB13 pT2/shP53/GFP/mPDGFB e pT/CMV-NRAS (os dois últimos plasmídeos gerados no laboratório do Dr. Gary Kohanbash).

Após 24 horas da injeção dos plasmídeos, a intensidade de bioluminescência *in vivo* (BLI) foi avaliada, e o ponto final foi definido quando os animais apresentaram um sinal forte de BLI e sinais clínicos como perda de peso corporal e prostração (no 42º dia), demonstrando a presença do tumor. Os animais então foram sacrificados, e o cérebro foi coletado e submetido à dissociação enzimática. As células em suspensão provenientes dessa dissociação foram colocadas em condições de cultivo celular. Todo o procedimento está descrito em detalhes na seção de métodos do manuscrito número 3 desta tese. Após ser estabelecida a linhagem celular SBGB, as células foram então implantadas em camundongos adultos.

No vigésimo dia após a injeção, os animais foram eutanasiados e o cérebro foi coletado. As amostras foram coletadas e divididas em grupos experimentais da seguinte forma: tecido do cérebro de camundongos saudáveis (1), do hemisfério não-tumoral (2), e da área do tumor e peritumoral (3). Os astrócitos da região peritumoral e do hemisfério livre de tumor foram submetidos à análise de sequenciamento de RNA de célula única (*Single-cell RNA sequencing* - scRNAseq). Astrócitos isolados de animais livres de tumor foram considerados controle. Para superar o desafio de separar os astrócitos das células de GB para a posterior realização do scRNAseq, o marcador ACSA-2 foi empregado.

ACSA-2 é a abreviação para *astrocyte cell surface antigen-2* (tradução livre: antígeno de superfície celular de astrócitos-2) e é um marcador utilizado para o isolamento de astrócitos de camundongos jovens e adultos. Os astrócitos ACSA-2⁺ apresentam co-expressão de outros marcadores astrocitários, como GFAP, S100β, ALDH1L1 e GLAST, e, interessante, são mais amplamente expressos em astrócitos do que o GFAP (20). De acordo com os dados apresentados no manuscrito, a população de astrócitos ACSA-2⁺ em todos os grupos experimentais também apresentou expressão de vários marcadores astrocitários, como *Solute Carrier Family 1 Member 2* (SLC1A2), proteína NDRG membro 2 (NDRG2), e GFAP, reforçando a identidade astrocitária dessas células. Além disso, não foi observada expressão de marcadores associados a outros tipos celulares, como microglia e oligodendrócitos, consistente com a pureza em astrócitos da população de células isoladas por *sorting*.

Subsequentemente, a variedade de 7 clusters diferenciais no grupo experimental de astrócitos saudáveis demonstrados pelos resultados obtidos no presente estudo evidenciou o papel crucial dos astrócitos em várias vias associadas à homeostase do SNC, como as vias de organização de sinapses, fosforilação oxidativa e respiração celular em geral e processos de diferenciação de células gliais. Ademais, os astrócitos saudáveis (isolados de animais controle que não receberam o implante das células tumorais) e os astrócitos isolados da hemisfério não-tumoral apresentaram-se muito semelhantes, enquanto os astrócitos da amostra coletada na região tumoral e peritumoral expressaram um perfil transcricional diferente.

Astrócitos isolados de animais controle ou do hemisfério não-tumoral apresentam enriquecimento dos clusters 1; 3; 4; 5; 7; 8; 11. Pegando como exemplo, o cluster 3 é caracterizado pelas vias de sinalização que controlam a organização de sinapses, sugerindo por exemplo envolvimento com a sinaptogênese, formação da memória e aprendizado. Já os astrócitos-associados ao tumor apresentam enriquecimento dos

clusters 2; 6; 9; 10; 12. A maioria desses clusters revelam estar associados a funções relacionadas ao processo de reatividade do astrócito. Dentre os clusters associados ao tumor, destacam-se os clusters 2 e 6. Esses dois clusters foram escolhidos para a discussão porque, além de eles demonstrarem a plasticidade do astrócito reativo por se tratar de dois fenótipos com perfis de expressão muito diferentes entre si, eles também representam populações fenotípicas de astrócitos que se encontram em grande número na amostra.

Mais especificamente, sugere-se que o cluster 2 estaria associado ao astrócito do tipo-A2, apresentando expressão de proteínas relacionadas à organização e “limpeza” de sinapses, também chamado de *pruning* de sinapses, incluindo as proteínas Camk1d (proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina tipo 1d), Gfap e Actb (Actina beta). É possível verificar um perfil semelhante nos cluster 9 e 10, onde no cluster 10 é possível verificar até o envolvimento de processos relacionados à formação da cicatriz glial, por causa do aumento na expressão de vimentina nesses astrócitos. Entretanto esses dois últimos clusters, apesar de revelarem-se específicos nas populações do TME, estão em menor número quando comparadas com o cluster 2. Já relacionado ao cluster 6, propõe-se que este seja um astrócito ativado em um perfil tipo-A1, um perfil clássico de ativação (24). Além de demonstrar aumento na expressão de vias biológicas ligadas à resposta celular frente ao lipopolissacarídeo, como a expressão de CD14, há o envolvimento com o recrutamento de células imunes, ação de grande importância para a formação do TME característico do GB. Esse mesmo perfil fenotípico pode também ser visualizado no cluster 12.

Considerando que o perfil de expressão gênica dos astrócitos purificados de cérebro de animais controle é similar ao dos astrócitos isolados do hemisfério livre de tumor, os resultados do manuscrito 3 sugerem que há a necessidade de um contato mais próximos entre as células tumorais e os astrócitos para que o *crosstalk* entre essas células seja efetivo. Entretanto, há a necessidade de realização de experimentos adicionais para se comprovar essa hipótese.

Além disso, o impacto da sinalização mediada pela adenosina na modulação do fenótipo dos astrócitos-associados ao tumor será melhor investigada, conforme descrito nas perspectivas dessa tese. Nesse sentido, dados preliminares de animais implantados com tumor e tratados com o inibidor farmacológico da CD73 (APCP) foram incluídos no Anexo II desta tese. A ilustração contendo o design do tratamento encontra-se também em anexo à tese. A análise do tamanho do tumor indica que os animais que receberam o tratamento com o APCP, e, portanto, tiveram o bloqueio da via de formação de adenosina,

tiveram tumores de menor tamanho quando comparados a animais do grupo controle, sugerindo que o tratamento com o bloqueador de CD73 teve efeitos relevantes na modificação da progressão do tumor e, possivelmente, no perfil do TME. Os dados do scRNAseq ainda estão em fase de análise preliminar e serão mais bem explorados para a sua posterior publicação.

Em outras palavras, os dados apresentados no capítulo 3 da presente tese demonstraram o impacto do TME no desenvolvimento de populações distintas de astrócitos reativos no GB, relacionadas tanto ao perfil do tipo-A1, clássico e pró-inflamatório, quanto ao tipo-A2, relacionado à regeneração tecidual e organização de sinapses. Consistente com a literatura existente, foi observada uma correlação entre vias inflamatórias e os padrões específicos de ativação dos astrócitos, como a presença/expressão de vias relacionadas à resposta celular aos lipopolissacarídeo. Ademais, sugere-se que a proximidade com o tumor seja caráter obrigatório para que haja o processo de ativação efetiva do astrócito.

A partir dos resultados expostos nos três capítulos desta tese, é possível propor que sinalização purinérgica/adenosinérgica é uma via importante para a polarização astrocítica, podendo ser utilizada para a classificação A1 e A2 de astrócitos. Além disso, o uso da via adenosinérgica como alvo terapêutico prova-se potencialmente interessante para o GB, já que essa proteína/enzima se mostra importante tanto para a biologia tumoral como para as células associadas ao tumor presentes no TME, dando suporte ao mesmo.

Em adição a isso, há evidências de que a inibição da CD73 em conjunto com a exposição à radiação ionizante possua um interessante efeito concomitante na diminuição da sobrevivência das células tumorais. Os resultados demonstrados no capítulo 2 dão suporte para a modulação da via adenosinérgica como um alvo biológico para o tratamento do GB, ferramenta que apresenta um imenso potencial de translação para a clínica, já que todos os pacientes com GB são submetidos ao tratamento radioterápico. Além disso, o bloqueio da sinalização adenosinérgica representa a tentativa de contornar um problema comum relacionado ao tratamento usual - o desenvolvimento de radioressistência – e dá esperança aos pacientes que a mais de três décadas não possuem alternativa terapêutica eficaz que traga maior sobrevida.

Os dados de scRNAseq obtidos a partir de amostras de animais controle contribuem para um melhor entendimento da heterogeneidade que os astrócitos apresentam em um contexto fisiológico que, nas nossas condições experimentais, foram classificados em 12 diferentes clusters. Os resultados presentes nesta tese também tornam

possível propor que, coerente com a literatura, os astrócitos associados ao tumor tenham características mistas de astrócitos A1 e A2, sob um espectro de ativação que respeita a complexidade que o TME possui. Adicionalmente, a comparação entre astrócitos-associados ao tumor e astrócitos do hemisfério sem tumor sugerem que há a necessidade de proximidade entre astrócitos e GB para que o crosstalk/modulação seja efetiva. Nesse sentido, o presente estudo representa um esforço pioneiro na caracterização dos perfis de ativação dos astrócitos usando um modelo animal de indução de GB com uma melhor representação do ambiente imunológico complexo do TME, e que a partir dos dados obtidos é possível dizer que os astrócitos são efetivamente modulados pelo tumor, podendo ser considerados como alvos para a terapia anti-GB.

CONCLUSÃO

Os resultados dessa tese destacam os efeitos da modulação da via adenosinérgica em diferentes parâmetros da progressão do GB. Por meio de extensa análise crítica da literatura, foi possível estabelecer o estado da arte relacionado ao envolvimento do sistema purinérgico e a ativação de astrócitos, bem como o delineamento do perfil de expressão de enzimas e receptores purinérgicos de acordo com os diferentes fenótipos de astrócitos ativados.

A partir dos dados gerados pela presente tese, foi também possível delimitar os efeitos da adenosina na resistência *in vitro* ao tratamento com radiação ionizante, demonstrando o potencial uso da enzima CD73 como alvo para melhorar a eficácia da radioterapia. Em adição a isso, os efeitos da comunicação entre células tumorais e astrócitos associados ao tumor provenientes do microambiente tumoral de glioblastomas foram descritos através do uso de ferramentas de análise de expressão por meio da ferramenta de *Single cell RNA-seq*.

Em suma, nossos resultados contribuem para o estabelecimento do papel dos astrócitos associados ao tumor no GB. Os dados obtidos aqui demonstrando as características adaptativas dos astrócitos e a excepcional plasticidade dessa célula no SNC, além das consequências do intercâmbio de astrócitos e células tumorais na imunomodulação do TME. Através de uma perspectiva inovadora, o presente trabalho demonstra o potencial da via adenosinérgica como novo alvo para a otimização da eficiência terapêutica do tratamento desse tumor agressivo e de baixa sobrevida na população. Nossos dados também apontam para o astrócito como um dos elementos participantes da progressão tumoral, merecendo uma atenção especial no design de novas modalidades terapêuticas para o GB.

PERPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos na presente tese, é possível delinear novos objetivos específicos a fim de explorar ainda mais as implicações da modulação da via adenosinérgica no processo de reatividade de astrócitos presentes no TME do GB. O nosso trabalho foi capaz de estabelecer uma base sólida na área por meio da publicação de um artigo de revisão analisando o estado da arte relacionado ao envolvimento de parâmetros purinérgicos na ativação de diferentes fenótipos de astrócitos. A realização deste trabalho foi motivada pela carência de literatura acerca do tema, combinada com a ocorrência da pandemia da COVID-19, que levou à interrupção das atividades presenciais nos laboratórios de pesquisa da Universidade.

A publicação revelou-se de sucesso, com *insights* valiosos e perguntas promissoras que ficam em aberto para serem exploradas após a realização desta tese. Embora a participação dos astrócitos na biologia do SNC tenha sido bem estabelecida, não há um consenso sobre a polarização astrocitária em diferentes fenótipos de acordo com a natureza da lesão, nem especificamente como esse processo ocorre nos tumores cerebrais. Estudos adicionais são necessários para descrever melhor suas características completas e principais aspectos em relação à ativação frente à diferentes distúrbios envolvendo componentes imunológicos. Além disso, estudos sobre a polarização astrocitária são necessários para entender se diferentes condições de lesão levam à produção de diferentes subpopulações de astrócitos A1/neurotóxicos e A2/neuroprotetores, ou a estágios de transição até que o estado celular completamente reativado seja alcançado. Além disso, poucos estudos têm se concentrado na ligação entre sinalização purinérgica e a participação dos astrócitos na constituição do nicho tumoral. Considerando o papel-chave da sinalização adenosinérgica na fisiopatologia do GB, a sua ação terapêutica deve ser mais bem descrita, bem como a relação que a liberação de adenosina no meio extracelular possui com o processo de ativação de astrócitos.

Nesse sentido, o segundo capítulo desta tese traz como principal achado o efeito concomitante da radiação ionizante e do bloqueio farmacológico da enzima CD73 através da administração de APCP. Foi observada a taxa de crescimento de diferentes linhagens celulares de GB, avaliando assim a resistência das células tumorais frente o tratamento radioterápico. Diante disso, torna-se interessante aprofundar os conhecimentos acerca dos efeitos não só no crescimento das células tumorais, mas também nos astrócitos associados ao tumor.

A radioterapia é amplamente utilizada pelos pacientes diagnosticados com GB, e possui modalidades de tratamento que combinam ciclos recorrentes de exposição à radiação ionizante (147). Uma vez que a reincidência pode estar associada com possíveis danos às células do SNC (148), tem-se a perspectiva de investigar os possíveis danos relacionados à radiação ionizante às células saudáveis que permanecem no tecido após a excisão cirúrgica do tumor. Através da realização de mais experimentos, o objetivo será determinar a relação entre a ativação do astrócito após a exposição ao estresse da radioterapia e a reincidência do GB nos pacientes.

Em relação ao capítulo final desta tese, a escolha em apresentá-lo na forma de um manuscrito em preparação justifica-se devido a nossa perspectiva de aprimorar a análise dos dados gerados pelo *Single cell RNA-seq* a fim de produzir uma publicação inovativa, de alto impacto e com extrema relevância no meio. O conjunto de dados apresentados foi gerado a partir de uma técnica de enriquecimento da amostra, que foi realizada no intuito de investigar as características específicas de astrócitos isolados de tecido saudável, comparando-as aos astrócitos obtidos a partir de amostras de tumor.

Além deste primeiro grupo de dados analisados no terceiro capítulo desta tese, estão em fase de processamento novos dados relativos a um novo experimento utilizando *Single cell RNA-seq* de amostras de tumor obtidas a partir de animais do mesmo modelo animal *in vivo* de indução de GB (a partir da injeção estereotáxica de células de uma linhagem de GB), mas agora tratados ou não com APCP, o bloqueador farmacológico de CD73 também utilizado no capítulo 2 desta tese. Em anexo nesta tese é apresentado resultados preliminares promissores demonstrando que os animais tratados com APCP apresentaram tumores significativamente menores em relação aos animais do grupo controle negativo ao final de 20 dias de tratamento. Nesse sentido, é proposto como perspectiva a análise da expressão gênica gerada a partir das amostras de tumor destes 2 grupos experimentais, no sentido de investigar as diferenças no perfil das células imunes presentes no TME dos animais em que a produção de adenosina foi bloqueada.

Também é proposto como perspectiva desta tese a retomada de objetivos específicos propostos no projeto de doutorado que não puderam ser concluídos durante o período devido a fatores externos, como por exemplo a ocorrência da COVID-19. Encontra-se em anexo nesta tese o trabalho de conclusão de curso da aluna Maria Paula de Medeiros, que teve seu trabalho coorientado durante a realização desta tese. Os experimentos realizados pela aluna tiveram como objetivo padronizar uma cultura de astrócitos corticais a partir de camundongos neonatos para a realização de estudos de

análise de polarização astrocítica *in vitro*. Em anexo encontra-se a capa do trabalho com o título do projeto, o resumo, os objetivos (geral e específicos), métodos e os resultados obtidos.

A partir dos dados levantados no trabalho de conclusão de curso da aluna, foi possível estabelecer e padronizar o cultivo de astrócitos primários de camundongos, com células viáveis e marcadas positivamente com o GFAP, como é possível observar nas imagens das culturas contidas no trabalho. Também foi possível verificar que o tratamento com os indutores de fenótipos reativos de astrócitos escolhidos, o LPS e o TGF β combinado à IL-10, não demonstrou citotoxicidade no ensaio de MTT. É importante lembrar que os testes realizados serviram como ponto de partida para avaliar a resposta astrocitária. Esses ensaios preliminares são de extrema importância, pois garantem células viáveis para futuros ensaios com astrócitos frente a esses tratamentos.

Diante do exposto, propõe-se como perspectiva ao trabalho realizar novos experimentos no sentido de melhor delimitar os fenótipos A1 e A2 de astrócitos reativos, bem como realizar ensaios de viabilidade celular mais específicos, uma vez que o ensaio de MTT revela dados de forma indireta, a partir da quantificação da atividade das desidrogenases mitocondriais. Após delimitar os fenótipos, a ideia é que se investigue o processo de ativação dos astrócitos associados ao tumor por meio tanto de co-cultivo direto de astrócitos e linhagens celulares de GB, como por cultivo de astrócitos em meio condicionado de GB, a fim de comparar com os fenótipos clássicos A1 a A2. Com esse experimento, buscamos trazer resultados que corroborem para a hipótese de espectro de ativação, onde será possível observar traços dos dois fenótipos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mark F. Bear, Barry W. Connors, Michael A. Paradiso. Bear, Mark F. Neurociências : desvendando o sistema nervoso . 4. ed. Porto Alegre: AstMed; 2017.
2. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* (1979). 12 de outubro de 2018;362(6411):181–5.
3. Kettenmann H, Verkhratsky A. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* dezembro de 2008;31(12):653–9.
4. Fan X, Agid Y. At the Origin of the History of Glia. *Neuroscience.* agosto de 2018;385:255–71.
5. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev.* 1º de janeiro de 2018;98(1):239–389.
6. Kurosinski P, Götz J. Glial Cells Under Physiologic and Pathologic Conditions. *Arch Neurol.* 1º de outubro de 2002;59(10):1524.
7. Auld DS, Robitaille R. Glial Cells and Neurotransmission. *Neuron.* outubro de 2003;40(2):389–400.
8. He F, Sun YE. Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):661–5.
9. Freeman MR. Specification and Morphogenesis of Astrocytes. *Science* (1979). 5 de novembro de 2010;330(6005):774–8.
10. Sofroniew M V., Vinters H V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 10 de janeiro de 2010;119(1):7–35.
11. Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia.* 12 de agosto de 2015;63(8):1320–9.
12. Díaz-Castro B, Robel S, Mishra A. Astrocyte Endfeet in Brain Function and Pathology: Open Questions. *Annu Rev Neurosci.* 10 de julho de 2023;46(1):101–21.
13. Shan L, Zhang T, Fan K, Cai W, Liu H. Astrocyte-Neuron Signaling in Synaptogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2 de julho de 2021;9.
14. Allen NJ, Eroglu C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron.* novembro de 2017;96(3):697–708.
15. Durkee CA, Araque A. Diversity and Specificity of Astrocyte–neuron Communication. *Neuroscience.* janeiro de 2019;396:73–8.
16. Boccazzi M, Ceruti S. Where do you come from and what are you going to become, reactive astrocyte? *Stem Cell Investig.* 12 de maio de 2016;3:15–15.
17. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic Analysis of Reactive Astroglia. *The Journal of Neuroscience.* 2 de maio de 2012;32(18):6391–410.
18. Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol.* janeiro de 2010;79(2):77–89.

19. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol.* fevereiro de 2015;32:121–30.
20. Kantzer CG, Boutin C, Herzig ID, Wittwer C, Reiß S, Tiveron MC, et al. Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes. *Glia.* junho de 2017;65(6):990–1004.
21. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O’Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci.* 15 de março de 2021;24(3):312–25.
22. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* junho de 2017;46(6):957–67.
23. Fan YY, Huo J. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochem Int.* setembro de 2021;148:105080.
24. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 18 de janeiro de 2017;541(7638):481–7.
25. Hasel P, Rose IVL, Sadick JS, Kim RD, Liddelow SA. Neuroinflammatory astrocyte subtypes in the mouse brain. *Nat Neurosci.* 19 de outubro de 2021;24(10):1475–87.
26. Khodadadei F, Arshad R, Morales DM, Gluski J, Marupudi NI, McAllister JP, et al. The effect of A1 and A2 reactive astrocyte expression on hydrocephalus shunt failure. *Fluids Barriers CNS.* 28 de setembro de 2022;19(1):78.
27. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics.* abril de 2017;14(2):284–97.
28. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol.* 1º de novembro de 2019;21(Supplement_5):v1–100.
29. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 6 de agosto de 2007;114(2):97–109.
30. Nandakumar P, Mansouri A, Das S. The Role of ATRX in Glioma Biology. *Front Oncol.* 29 de setembro de 2017;7.
31. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2 de agosto de 2021;23(8):1231–51.
32. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 1º de outubro de 2014;23(10):1985–96.
33. Nørøxe DS, Poulsen HS, Lassen U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open.* 2016;1(6):e000144.
34. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors

- of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 9 de junho de 2016;131(6):803–20.
35. Whitfield BT, Huse JT. Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathology.* 14 de julho de 2022;32(4).
 36. van der Meulen M, Ramos RC, Mason WP, Von Deimling A, Maas SLN. Opinion & Special Article: Glioma Classification. *Neurology.* 15 de novembro de 2022;99(20):903–8.
 37. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine.* 10 de março de 2005;352(10):987–96.
 38. Agarwala SS, Kirkwood JM. Temozolomide, a Novel Alkylating Agent with Activity in the Central Nervous System, May Improve the Treatment of Advanced Metastatic Melanoma. *Oncologist.* 1º de abril de 2000;5(2):144–51.
 39. Lattanzio L, Borgognone M, Mocellini C, Giordano F, Favata E, Fasano G, et al. MGMT Promoter Methylation and Glioblastoma: A Comparison of Analytical Methods and of Tumor Specimens. *Int J Biol Markers.* 18 de abril de 2015;30(2):208–16.
 40. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-Repair Gene *MGMT* and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *New England Journal of Medicine.* 9 de novembro de 2000;343(19):1350–4.
 41. Dapash M, Hou D, Castro B, Lee-Chang C, Lesniak MS. The Interplay between Glioblastoma and Its Microenvironment. *Cells.* 31 de agosto de 2021;10(9):2257.
 42. Dymova MA, Kuligina E V., Richter VA. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 15 de junho de 2021;22(12):6385.
 43. Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG, Sarkaria JN, Markert JM, et al. Acquisition of Temozolomide Chemoresistance in Gliomas Leads to Remodeling of Mitochondrial Electron Transport Chain. *Journal of Biological Chemistry.* dezembro de 2010;285(51):39759–67.
 44. Frederico SC, Hancock JC, Brettschneider EES, Ratnam NM, Gilbert MR, Terabe M. Making a Cold Tumor Hot: The Role of Vaccines in the Treatment of Glioblastoma. *Front Oncol.* 10 de maio de 2021;11.
 45. Pant A, Lim M. CAR-T Therapy in GBM: Current Challenges and Avenues for Improvement. *Cancers (Basel).* 16 de fevereiro de 2023;15(4):1249.
 46. Gatto L, Di Nunno V, Franceschi E, Tosoni A, Bartolini S, Brandes AA. Pharmacotherapeutic Treatment of Glioblastoma: Where Are We to Date? *Drugs.* 9 de abril de 2022;82(5):491–510.
 47. DeCordova S, Shastri A, Tsolaki AG, Yasmin H, Klein L, Singh SK, et al. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Front Immunol.* 17 de julho de 2020;11.
 48. Wu W, Klockow JL, Zhang M, Lafortune F, Chang E, Jin L, et al. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacol Res.* setembro de 2021;171:105780.

49. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia*. 28 de agosto de 2011;59(8):1169–80.
50. Quail DF, Joyce JA. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell*. março de 2017;31(3):326–41.
51. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 19 de setembro de 2013;501(7467):346–54.
52. Rajendran L, Bali J, Barr MM, Court FA, Krämer-Albers EM, Picou F, et al. Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the Nervous System. *The Journal of Neuroscience*. 12 de novembro de 2014;34(46):15482–9.
53. Khan F, Pang L, Dunterman M, Lesniak MS, Heimberger AB, Chen P. Macrophages and microglia in glioblastoma: heterogeneity, plasticity, and therapy. *Journal of Clinical Investigation*. 3 de janeiro de 2023;133(1).
54. Henrik Heiland D, Ravi VM, Behringer SP, Frenking JH, Wurm J, Joseph K, et al. Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat Commun*. 11 de junho de 2019;10(1):2541.
55. Müller S, Kohanbash G, Liu SJ, Alvarado B, Carrera D, Bhaduri A, et al. Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biol*. 20 de dezembro de 2017;18(1):234.
56. Sharma P, Aaroe A, Liang J, Puduvalli VK. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. *Neurooncol Adv*. 1º de janeiro de 2023;5(1).
57. Guan X, Hasan MN, Maniar S, Jia W, Sun D. Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme. *Mol Neurobiol*. 23 de agosto de 2018;55(8):6927–38.
58. Goenaga J, Araque A, Kofuji P, Herrera Moro Chao D. Calcium signaling in astrocytes and gliotransmitter release. *Front Synaptic Neurosci*. 2 de março de 2023;15.
59. Brandao M, Simon T, Critchley G, Giamas G. Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment. *Glia*. 21 de maio de 2019;67(5):779–90.
60. Perelroizen R, Philosof B, Budick-Harmelin N, Chernobylsky T, Ron A, Katzir R, et al. Astrocyte immunometabolic regulation of the tumour microenvironment drives glioblastoma pathogenicity. *Brain*. 14 de setembro de 2022;145(9):3288–307.
61. Zhang C bao, Wang Z liang, Liu H jie, Wang Z, Jia W. Characterization of tumor-associated reactive astrocytes in gliomas by single-cell and bulk tumor sequencing. *Front Neurol*. 21 de junho de 2023;14.
62. Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*. 25 de dezembro de 2013;9(4):491–540.
63. Di Virgilio F, Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*. 20 de janeiro de 2017;36(3):293–303.
64. Ferrari D, McNamee EN, Idzko M, Gambari R, Eltzschig HK. Purinergic Signaling During Immune Cell Trafficking. *Trends Immunol*. junho de 2016;37(6):399–411.

65. Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rébé C. Production of Adenosine by Ectonucleotidases: A Key Factor in Tumor Immunoescape. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:1–9.
66. Ai Y, Wang H, Liu L, Qi Y, Tang S, Tang J, et al. Purine and purinergic receptors in health and disease. *MedComm (Beijing)*. 7 de outubro de 2023;4(5).
67. Xing J, Zhang J, Wang J. The Immune Regulatory Role of Adenosine in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 5 de outubro de 2023;24(19):14928.
68. Azambuja JH, Gelsleichter NE, Beckenkamp LR, Iser IC, Fernandes MC, Figueiró F, et al. CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. *Mol Neurobiol*. 16 de maio de 2019;56(5):3260–79.
69. Alvarez CL, Troncoso MF, Espelt M V. Extracellular ATP and adenosine in tumor microenvironment: Roles in epithelial–mesenchymal transition, cell migration, and invasion. *J Cell Physiol*. 12 de janeiro de 2022;237(1):389–400.
70. Branganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppés D, Meurer L, Edelweiss MIA, et al. Selective NTPDase2 expression modulates *in vivo* rat glioma growth. *Cancer Sci*. 10 de agosto de 2009;100(8):1434–42.
71. Di Virgilio F, Sarti AC, Coutinho-Silva R. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1º de maio de 2020;318(5):C832–5.
72. Draganov D, Lee PP. Purinergic Signaling Within the Tumor Microenvironment. *Em* 2021. p. 73–87.
73. Xia C, Yin S, To KKW, Fu L. CD39/CD73/A2AR pathway and cancer immunotherapy. *Mol Cancer*. 2 de março de 2023;22(1):44.
74. Azambuja JH, Ludwig N, Branganhol E, Whiteside TL. Inhibition of the Adenosinergic Pathway in Cancer Rejuvenates Innate and Adaptive Immunity. *Int J Mol Sci*. 14 de novembro de 2019;20(22):5698.
75. Azambuja JH, da Silveira EF, de Carvalho TR, Oliveira PS, Pacheco S, do Couto CT, et al. Glioma sensitive or chemoresistant to temozolomide differentially modulate macrophage protumor activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. novembro de 2017;1861(11):2652–62.
76. Jin K, Mao C, Chen L, Wang L, Liu Y, Yuan J. Adenosinergic Pathway: A Hope in the Immunotherapy of Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 10 de janeiro de 2021;13(2):229.
77. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2 de julho de 2013;110(27):11091–6.
78. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26 de janeiro de 2010;107(4):1547–52.
79. Azambuja JH, Schuh RS, Michels LR, Gelsleichter NE, Beckenkamp LR, Iser IC, et al. Nasal Administration of Cationic Nanoemulsions as CD73-siRNA Delivery

- System for Glioblastoma Treatment: a New Therapeutical Approach. *Mol Neurobiol.* 12 de fevereiro de 2020;57(2):635–49.
80. Rodrigues RJ, Tomé AR, Cunha RA. ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Front Neurosci.* 28 de abril de 2015;9.
 81. Illes P, Burnstock G, Tang Y. Astroglia-Derived ATP Modulates CNS Neuronal Circuits. *Trends Neurosci.* dezembro de 2019;42(12):885–98.
 82. Campos-Contreras A del R, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Cuevas FG. Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. *Cells.* 3 de julho de 2020;9(7):1612.
 83. Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Schwartzmann G, Sarkis JJF, et al. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett.* agosto de 2003;198(2):211–8.
 84. Irvin DM, McNeill RS, Bash RE, Miller CR. Intrinsic Astrocyte Heterogeneity Influences Tumor Growth in Glioma Mouse Models. *Brain Pathology.* 13 de janeiro de 2017;27(1):36–50.
 85. Verdugo E, Puerto I, Medina MÁ. An update on the molecular biology of glioblastoma, with clinical implications and progress in its treatment. *Cancer Commun.* 21 de novembro de 2022;42(11):1083–111.
 86. Schmid RS, Vitucci M, Miller CR. Genetically engineered mouse models of diffuse gliomas. *Brain Res Bull.* maio de 2012;88(1):72–9.
 87. Watkins S, Robel S, Kimbrough IF, Robert SM, Ellis-Davies G, Sontheimer H. Disruption of astrocyte–vascular coupling and the blood–brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun.* 19 de junho de 2014;5(1):4196.
 88. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* (1979). 3 de abril de 2015;348(6230):74–80.
 89. Broekman ML, Maas SLN, Abels ER, Mempel TR, Krichevsky AM, Breakefield XO. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol.* 9 de agosto de 2018;14(8):482–95.
 90. Pasqualini C, Kozaki T, Bruschi M, Nguyen THH, Minard-Colin V, Castel D, et al. Modeling the Interaction between the Microenvironment and Tumor Cells in Brain Tumors. *Neuron.* dezembro de 2020;108(6):1025–44.
 91. Cheng N, Bai X, Shu Y, Ahmad O, Shen P. Targeting tumor-associated macrophages as an antitumor strategy. *Biochem Pharmacol.* janeiro de 2021;183:114354.
 92. MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* dezembro de 2004;25(12):677–86.
 93. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaceli S, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* setembro de 2018;233(9):6425–40.
 94. See AP, Parker JJ, Waziri A. The role of regulatory T cells and microglia in glioblastoma-associated immunosuppression. *J Neurooncol.* 30 de julho de 2015;123(3):405–12.

95. Caverzán MD, Beaugé L, Oliveda PM, Cesca González B, Bühler EM, Ibarra LE. Exploring Monocytes-Macrophages in Immune Microenvironment of Glioblastoma for the Design of Novel Therapeutic Strategies. *Brain Sci.* 24 de março de 2023;13(4):542.
96. Jha MK, Jo M, Kim JH, Suk K. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *The Neuroscientist.* 22 de junho de 2019;25(3):227–40.
97. Clarke LE, Liddel SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 20 de fevereiro de 2018;115(8).
98. Chen W, Wang D, Du X, He Y, Chen S, Shao Q, et al. Glioma cells escaped from cytotoxicity of temozolomide and vincristine by communicating with human astrocytes. *Medical Oncology.* 29 de março de 2015;32(3):43.
99. Lian H, Litvinchuk A, Chiang ACA, Aithmitti N, Jankowsky JL, Zheng H. Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience.* 13 de janeiro de 2016;36(2):577–89.
100. Yun SP, Kam TI, Panicker N, Kim S, Oh Y, Park JS, et al. Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat Med.* 11 de julho de 2018;24(7):931–8.
101. Liang P, Zhang X, Zhang Y, Wu Y, Song Y, Wang X, et al. Neurotoxic A1 astrocytes promote neuronal ferroptosis via CXCL10/CXCR3 axis in epilepsy. *Free Radic Biol Med.* fevereiro de 2023;195:329–42.
102. Chen W, Xia T, Wang D, Huang B, Zhao P, Wang J, et al. Human astrocytes secrete IL-6 to promote glioma migration and invasion through upregulation of cytomembrane MMP14. *Oncotarget.* 20 de setembro de 2016;7(38):62425–38.
103. Mega A, Hartmark Nilsen M, Leiss LW, Tobin NP, Miletic H, Sleire L, et al. Astrocytes enhance glioblastoma growth. *Glia.* 11 de fevereiro de 2020;68(2):316–27.
104. Nieland L, Morsett LM, Broekman MLD, Breakefield XO, Abels ER. Extracellular Vesicle-Mediated Bilateral Communication between Glioblastoma and Astrocytes. *Trends Neurosci.* março de 2021;44(3):215–26.
105. Oushy S, Hellwinkel JE, Wang M, Nguyen GJ, Gunaydin D, Harland TA, et al. Glioblastoma multiforme-derived extracellular vesicles drive normal astrocytes towards a tumour-enhancing phenotype. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 5 de janeiro de 2018;373(1737):20160477.
106. van der Vos KE, Abels ER, Zhang X, Lai C, Carrizosa E, Oakley D, et al. Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain. *Neuro Oncol.* janeiro de 2016;18(1):58–69.
107. Azambuja JH, Schuh RS, Michels LR, Iser IC, Beckenkamp LR, Roliano GG, et al. Blockade of CD73 delays glioblastoma growth by modulating the immune environment. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 29 de setembro de 2020;69(9):1801–12.
108. Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia.* 26 de julho de 2013;61(7):1113–21.

109. Pangršič T, Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Fabbretti E, Nistri A, et al. Exocytotic Release of ATP from Cultured Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. setembro de 2007;282(39):28749–58.
110. Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, et al. Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture. *Journal of Biological Chemistry*. janeiro de 2003;278(2):1354–62.
111. Stout CE, Costantin JL, Naus CCG, Charles AC. Intercellular Calcium Signaling in Astrocytes via ATP Release through Connexin Hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*. março de 2002;277(12):10482–8.
112. Suadicaní SO, Iglesias R, Wang J, Dahl G, Spray DC, Scemes E. ATP signaling is deficient in cultured pannexin1-null mouse astrocytes. *Glia*. 12 de julho de 2012;60(7):1106–16.
113. Ma Z, Stork T, Bergles DE, Freeman MR. Neuromodulators signal through astrocytes to alter neural circuit activity and behaviour. *Nature*. 9 de novembro de 2016;539(7629):428–32.
114. Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Lenz G, Zerbini LF, Libermann TA, et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience*. janeiro de 2006;138(2):421–32.
115. Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, et al. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood*. 15 de abril de 2002;99(8):2801–9.
116. Lavrња I, Laketa D, Savić D, Božić I, Bjelobaba I, Peković S, et al. Expression of a Second Ecto-5'-Nucleotidase Variant Besides the Usual Protein in Symptomatic Phase of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Molecular Neuroscience*. 19 de abril de 2015;55(4):898–911.
117. Moidunny S, Vinet J, Wesseling E, Bijzet J, Shieh CH, van Ijzendoorn SC, et al. Adenosine A2B receptor-mediated leukemia inhibitory factor release from astrocytes protects cortical neurons against excitotoxicity. *J Neuroinflammation*. 16 de dezembro de 2012;9(1):198.
118. Fusco I, Ugolini F, Lana D, Coppi E, Dettori I, Gaviano L, et al. The Selective Antagonism of Adenosine A2B Receptors Reduces the Synaptic Failure and Neuronal Death Induced by Oxygen and Glucose Deprivation in Rat CA1 Hippocampus in Vitro. *Front Pharmacol*. 24 de abril de 2018;9.
119. Rebola N, Lujan R, Cunha RA, Mulle C. Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron*. janeiro de 2008;57(1):121–34.
120. Cunha RA. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *J Neurochem*. 16 de dezembro de 2016;139(6):1019–55.
121. Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, et al. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer*. 23 de dezembro de 2006;6(1):226.

122. Tamajusuku ASK, Villodre ES, Paulus R, Coutinho-Silva R, Battasstini AMO, Wink MR, et al. Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *J Cell Biochem.* 12 de abril de 2010;109(5):983–91.
123. Kan LK, Drill M, Jayakrishnan PC, Sequeira RP, Galea E, Todaro M, et al. P2X7 receptor antagonism by AZ10606120 significantly reduced in vitro tumour growth in human glioblastoma. *Sci Rep.* 24 de maio de 2023;13(1):8435.
124. Schaue D, McBride WH. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 30 de setembro de 2015;12(9):527–40.
125. Chédeville AL, Madureira PA. The Role of Hypoxia in Glioblastoma Radiotherapy Resistance. *Cancers (Basel).* 1º de fevereiro de 2021;13(3):542.
126. Gu J, Mu N, Jia B, Guo Q, Pan L, Zhu M, et al. Targeting radiation-tolerant persister cells as a strategy for inhibiting radioresistance and recurrence in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 1º de julho de 2022;24(7):1056–70.
127. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.* 8 de março de 2021;18(3):170–86.
128. Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer.* 24 de julho de 2015;15(7):409–25.
129. Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, Clark AJ, Ivan ME, Sun MZ, et al. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *J Transl Med.* 2014;12(1):107.
130. Szatmári T, Lumnitzky K, Désaknai S, Trajcevski S, Hídvégi EJ, Hamada H, et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci.* 26 de junho de 2006;97(6):546–53.
131. Martínez-Murillo R, Martínez A. Standardization of an orthotopic mouse brain tumor model following transplantation of CT-2A astrocytoma cells. *Histol Histopathol.* dezembro de 2007;22(12):1309–26.
132. Genoud V, Espinoza FI, Marinari E, Rochemont V, Dietrich PY, McSheehy P, et al. Treating ICB-resistant glioma with anti-CD40 and mitotic spindle checkpoint controller BAL101553 (lisavanbulin). *JCI Insight.* 22 de setembro de 2021;6(18).
133. Maeoka R, Ouji Y, Nakazawa T, Matsuda R, Morimoto T, Yokoyama S, et al. Local administration of shikonin improved the overall survival in orthotopic murine glioblastoma models with temozolomide resistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* outubro de 2023;166:115296.
134. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* janeiro de 2010;17(1):98–110.
135. Murao A, Aziz M, Wang H, Brenner M, Wang P. Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis.* 13 de abril de 2021;26(3–4):152–62.
136. Bill MA, Srivastava K, Breen C, Butterworth KT, McMahon SJ, Prise KM, et al. Dual effects of radiation bystander signaling in urothelial cancer: purinergic-

- activation of apoptosis attenuates survival of urothelial cancer and normal urothelial cells. *Oncotarget*. 14 de novembro de 2017;8(57):97331–43.
137. Ashrafizadeh M, Farhood B, Eleojo Musa A, Taeb S, Najafi M. Damage-associated molecular patterns in tumor radiotherapy. *Int Immunopharmacol*. setembro de 2020;86:106761.
 138. Zhu M, Yang M, Zhang J, Yin Y, Fan X, Zhang Y, et al. Immunogenic Cell Death Induction by Ionizing Radiation. *Front Immunol*. 20 de agosto de 2021;12.
 139. Bao X, Xie L. Targeting purinergic pathway to enhance radiotherapy-induced immunogenic cancer cell death. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 15 de dezembro de 2022;41(1):222.
 140. Eisenbarth D, Wang YA. Glioblastoma heterogeneity at single cell resolution. *Oncogene*. 30 de junho de 2023;42(27):2155–65.
 141. Galland F, Seady M, Taday J, Smaili SS, Gonçalves CA, Leite MC. Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochem Int*. dezembro de 2019;131:104538.
 142. Tichy J, Spechtmeyer S, Mittelbronn M, Hattingen E, Rieger J, Senft C, et al. Prospective evaluation of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a diagnostic marker for glioblastoma. *J Neurooncol*. 30 de janeiro de 2016;126(2):361–9.
 143. Wiesner SM, Decker SA, Larson JD, Ericson K, Forster C, Gallardo JL, et al. *De novo* Induction of Genetically Engineered Brain Tumors in Mice Using Plasmid DNA. *Cancer Res*. 15 de janeiro de 2009;69(2):431–9.
 144. Tschida BR, Largaespada DA, Keng VW. Mouse models of cancer: Sleeping Beauty transposons for insertional mutagenesis screens and reverse genetic studies. *Semin Cell Dev Biol*. março de 2014;27:86–95.
 145. Fujita M, Scheurer ME, Decker SA, McDonald HA, Kohanbash G, Kastenhuber ER, et al. Role of Type 1 IFNs in Antiglioma Immunosurveillance—Using Mouse Studies to Guide Examination of Novel Prognostic Markers in Humans. *Clinical Cancer Research*. 1º de julho de 2010;16(13):3409–19.
 146. Haddad AF, Young JS, Amara D, Berger MS, Raleigh DR, Aghi MK, et al. Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies. *Neurooncol Adv*. 1º de janeiro de 2021;3(1).
 147. Minniti G, Niyazi M, Alongi F, Navarria P, Belka C. Current status and recent advances in reirradiation of glioblastoma. *Radiation Oncology*. 18 de dezembro de 2021;16(1):36.
 148. Fletcher-Sananikone E, Kanji S, Tomimatsu N, Di Cristofaro LFM, Kollipara RK, Saha D, et al. Elimination of Radiation-Induced Senescence in the Brain Tumor Microenvironment Attenuates Glioblastoma Recurrence. *Cancer Res*. 1º de dezembro de 2021;81(23):5935–47.

Anexo I: Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal *University of Pittsburgh*

31/10/2022 12:55

Print: IS00021912 - Peptide vaccine combinations for the treatment of pediatric CNS tumors (3)



Date: Monday, October 31, 2022 12:55:17 PM

[Print](#)[Close](#)

View: SF - Protocol Identification

Section: Protocol Information

Protocol Identification



1.0 * **Main Title:**

Peptide vaccine combinations for the treatment of pediatric CNS tumors (3)

2.0

Additional Titles:

Immune Checkpoint Approaches to Glioblastoma

Oncolytic HSV therapy for pediatric gliomas

CD11b ANTIBODY FRAGMENTS AS PET IMAGING PROBES FOR GLIOMA-ASSOCIATED MYELOID CELLS

SGL-110 in combination with peptide vaccine immunotherapy for diffuse intrinsic pontine glioma

Engineered antibody fragments for PET imaging of immunotherapeutic targets in gliomas

Theranostic antibody for improving immuno-therapy and immune monitoring in glioma

Engineered Antibodies as PET Probes for Monitoring Immunotherapy Responses

Advancing Peptide Vaccine Immunotherapy for Children with Brain Tumors

Dual-Labeled Biotracer for the Identification of Neuroblastoma Lesions to Improve Surgical Outcome

Novel Theranostic approach to target Tumor infiltrating Macrophages using 89Zr-PET imaging and 177Lu/225Ac-Radioimmunotherapy

3.0 *** Principal Investigator:**

Gary Kohanbash

4.0

Protocol Sponsor (if PI is not a full-time faculty member):

5.0 **Protocol Administrator:**

If you would like to designate someone to manage the correspondence for the review of this protocol, enter their name below. This individual will have the ability to edit the protocol and respond to questions for the Principal Investigator during the review process. He/she will also have the ability submit annual renewal requests. This need not be an animal user, although the standard IACUC training is required for this role.

6.0 **Other Protocol Editors:**

List any additional personnel who will work on the protocol during the review process. Make sure to add any personnel who will use animals in the General Staff or Surgical Staff sections even if they are listed here.

Name	E-Mail	Employer
Christy Smolak	CWYANT@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Pharmacology

7.0 **General Staff:**

List all non-surgical staff (including PI) who will

Name	E-Mail	Employer
Lisa Bailey	LSBAILEY@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Immunology
Kathryn Day	KED63@pitt.edu	U of Pgh Office of the SVC Health Sciences Biomedical Science Tower
Gabriela Debom	DEBOMGN@pitt.edu	Other
Lesley Foley	LMF107@pitt.edu	U of Pgh
David Guerrero	DAG198@pitt.edu	Other
Thomas Hitchens	TKH17@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Neurobiology
Gary Kohanbash	GAK44@pitt.edu	U of Pgh
Joseph Latoche	JDL10@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Radiology
Bo Li	BOL47@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Neurological Surgery

<https://www.aro.pitt.edu/aro/sd/ResourceAdministration/Project/PrintSmartForms?Project=com.webbridge.entity.Entity%5BBOID%5BB658DBBFE9A59643BF0C0...> 4/159

8.0 **Surgical Staff:**
List all personnel (including PI) who will perform surgical manipulations.

Name	E-Mail	Employer
Lisa Bailey	LSBAILEY@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Immunology
Kathryn Day	KED63@pitt.edu	U of Pgh Office of the SVC Health Sciences Biomedical Science Tower
Gabriela Debom	DEBOMGN@pitt.edu	Other
Lesley Foley	LMF107@pitt.edu	U of Pgh
David Guerrero	DAG198@pitt.edu	Other
Thomas Hitchens	TKH17@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Neurobiology

<https://www.aro.pitt.edu/aro/sd/ResourceAdministration/Project/PrintSmartForms?Project=com.webbridge.entity.Entity%5BBOID%5BB658DBBFE9A59643BF0C0...> 6/159

Name	E-Mail	Employer
Itay Raphael	RAI18@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Immunology
Lauren Rosenblum	rosenblumlt@upmc.edu	Other
ReidAnn Sever	RES197@pitt.edu	Other
Christy Smolak	CWYANT@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Pharmacology
Chaim Sneiderman	CTS36@pitt.edu	U of Pgh Associate Vice Chancellor of Human Resources All Temps
Sarah Vincze	SRV32@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Neurological Surgery

9.0 **Observers:**

List any individuals who will have no contact with live animals and for whom you are requesting an exemption from the IACUC's species specific training. Please note that the Principal Investigator may not request a training exemption.

Name	E-Mail	Employer
------	--------	----------

There are no items to display

9.1 **Please describe the project role(s) of each of**

10.0 If any personnel listed above are affiliated with an institution outside the University of Pittsburgh, please indicate the person's name and the University or Institute.

- This includes individuals who are attending teaching, training, or demonstration sessions

- Note: Studies requiring GLP compliance cannot be conducted at the University of Pittsburgh. If you select "Yes" to this question you will not be able to submit this protocol. Click for more information.

- <https://www.aro.pitt.edu/aro/sd/ResourceAdministration/Project/PrintSmartForms?Project=com.webridge.entity.Entity%5BROID%5BB658DBBFE9A59643BF0C0...> 8/159

Work: (412) 647-3685

cell: 412.894.6091

- 14.0 *** Provide the name of one or more persons (other than the PI) that may be be contacted in the event of an emergency regarding animal health.**

Lauren McCarl

- 15.0 *** Provide the 24 hour phone or pager number for the PI and person(s) named above that may be contacted in the event of an emergency.**

Gary Kohanbash-412.894.6091, Lauren McCarl-412.721.7986

Anexo II: Design experimental e resultados parciais estudo *in vivo* da administração de APCP em camundongos

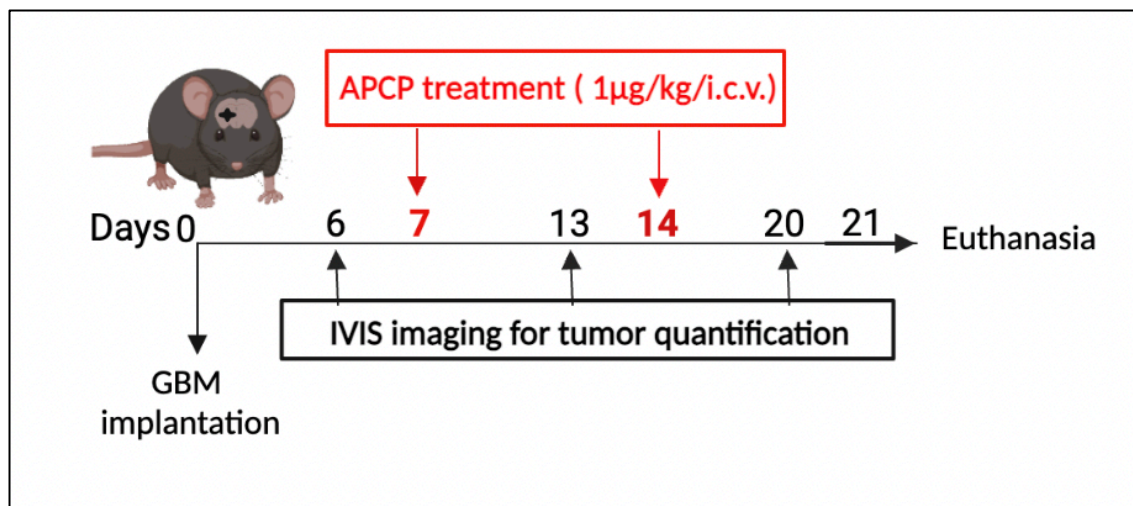


Figure 1: Experimental timeline.

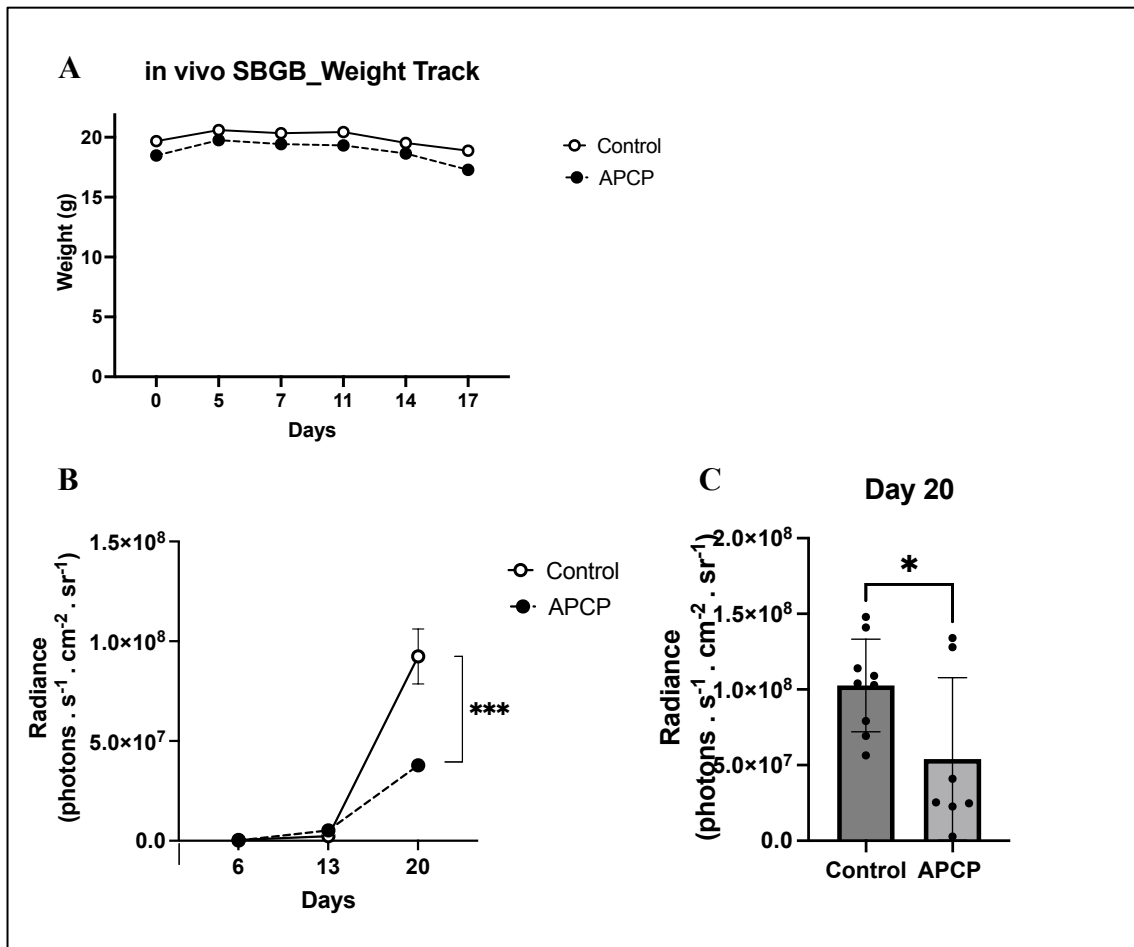


Figure 2: (A) Weight track of animals from negative control and treated with APCP. (B) Luminescence intensity of tumors across the days and (C) on day 20. Data are presented as mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, in (B) two-way analysis of variance (ANOVA) with Sidak's multiple comparison test, and in (C) unpaired t test.

Anexo III: Trabalho de Conclusão de Curso aluna Maria Paula de Medeiros

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
CURSO DE FARMÁCIA

MARIA PAULA DE MEDEIROS

**PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE CULTURA PRIMÁRIA PARA O
ESTUDO DOS ASTRÓCITOS ASSOCIADOS AO GLIOBLASTOMA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Porto Alegre
2023**

RESUMO

DE MEDEIROS, Maria Paula. **Padronização de uma técnica de cultura primária para o estudo dos astrócitos associados ao glioblastoma.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Farmácia. Universidade Federal das Ciências da Saúde de Porto Alegre. Porto Alegre, 2023.

Os astrócitos são células gliais essenciais para o bom funcionamento do SNC, participando da barreira hemato-encefálica, regulação metabólica e neurotransmissão. Em cenário de injúria cerebral, essas células passam por um espectro de ativação, podendo adquirir dois fenótipos distintos, A1 e A2. O perfil A1, também conhecido como neuroinflamatório, pode ser ativado por LPS enquanto o perfil A2, conhecido como neuroprotetor, pode ser ativado por IL-10 e TGF β . O glioblastoma é um tumor extremamente agressivo que acomete o SNC e pode desencadear esse processo de ativação astrocitária. Tendo em vista possibilitar o estudo dos astrócitos frente ao glioblastoma, o objetivo do presente trabalho foi padronizar uma cultura de astrócitos corticais a partir de camundongos da linhagem C57/BL-6 neonatos. A partir da padronização e verificação da pureza da cultura, foram realizados ensaios de imunocitoquímica e MTT para apurar a viabilidade celular dos astrócitos frente ao LPS (como modelo de indução de perfil A1) e ao conjunto de IL-10 e TGF β (como modelo de indução de perfil A2). Os resultados obtidos mostraram que ao submeter os astrócitos aos tratamentos, a viabilidade celular não foi afetada, possibilitando o uso desses protocolos de padronização e indução de fenótipos para futuros trabalhos do grupo. O estudo dos astrócitos associados ao glioblastoma possibilitam abrir caminho para novas propostas de alvos e terapias com base em seu potencial terapêutico.

Palavras-chave: Cultivo celular primário. Astrócitos. Astroglíose Reativa. Glioblastoma. Microambiente Tumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Padronizar uma cultura de astrócitos corticais a partir de camundongos neonatos para a realização de estudos de análise de polarização astrocítica.

3.1.1 Objetivos Específicos

1. Padronizar o protocolo de realização de culturas primárias de astrócitos corticais a partir de camundongos neonatos da linhagem C57/BL-6.
2. Realizar uma análise qualitativa do grau de pureza das culturas de astrócitos produzidas utilizando a proteína GFAP como marcador.
3. Avaliar a viabilidade celular das culturas primárias de astrócitos frente a indução dos fenótipos A1 e A2, utilizando o tratamento com LPS e a combinação de TGF β e IL-10, respectivamente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os materiais utilizados para a realização desse estudo estão apresentados na **Tabela 1** (abaixo). Os demais solventes e outros reagentes não citados na tabela são de grau analítico.

Tabela 1. Materiais utilizados.

Reagente	Marca	Número de identificação
Cultura celular		
DMEM- Dulbecco's modified Eagle's high glucose	Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)	11965084
HEPES- Ácido 4- (2- hidroxietil) piperazina- 1- etanossulfônico, N- (2- hidroxietil) piperazina- N' - (ácido 2-etanossulfônico)	Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)	7365-45-9
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	Neon Comercial Ltda, BRL	1715
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)	12657-029
Fungizone	Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)	15290- 018
Penicillin/streptomycin	Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)	15140-122
Imunocitoquímica		
DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole	Molecular Probes – Life Technologies	D-3571
AntiGFAP antibody clone 2E8 rabbit monoclonal	Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)	ZRB2383
Anti-rabbit Alexa 555	LifeTechnol (LifeTechnologies, Carlsbad, Califórnia, USA)	A21428
Solução bloqueadora	7% SFB 0,2% Tween 20 q.s.p. PBS filtrado	x
PBS 1x	100mL milliQ water / 0,8g NaCl, 0,02g KCl, 0,115g Na ₂ HPO ₄ e 0,02g KH ₂ PO ₄ pH 7.4	x
LPS - lipopolissacarídeo	Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)	L2630
Recombinant Mouse TGF-β1 (carrier-free)	BioLegend (BioLegend, San Diego, Califórnia, USA)	763102
Recombinant Murine IL-10	Peptrotech (Peptrotech, Inc. England)	210-10
Fluoromount-G	Invitrogen (Waltham, Massachusetts, USA)	495802
MTT		
MTT - Adenosine-monophosphate (AMP), 3,(4,5-dimethyl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide salt	Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)	M2128
Dimetil Sulfoxido PA (DMSO)	Nuclear	311734
Outros		
Poli-L-lisina	Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)	P1274-25MG
Cloreto de sódio P.A. (NaCl)	Nuclear	319290
Cloreto de potássio P.A. (KCl)	Dinâmica (Indaituba, SP, Brasil)	1526
Fosfato de sódio bibásico anidro (Na ₂ HPO ₄)	Dinâmica (Indaituba, SP, Brasil)	P.10.0513.012.09.30
Fosfato de Potássio monobásico anidro P.A. (KH ₂ PO ₄)	Nuclear	311860
Glicose-D Anidra P.A. (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Nuclear	316508
Sulfato de Sódio Anidro P.A. (Na ₂ SO ₄)	Synth (Diadema, São Paulo, Brasil)	01S2032.01.AH

Fonte: Autoria própria, 2023.

4.2. Métodos

4.2.1 Uso de animais

O projeto foi previamente aprovado pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) e possui parecer número 653/19, obedecendo a resolução 38/2018 da CONSEA (Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal) sobre os parâmetros de bem-estar animal.

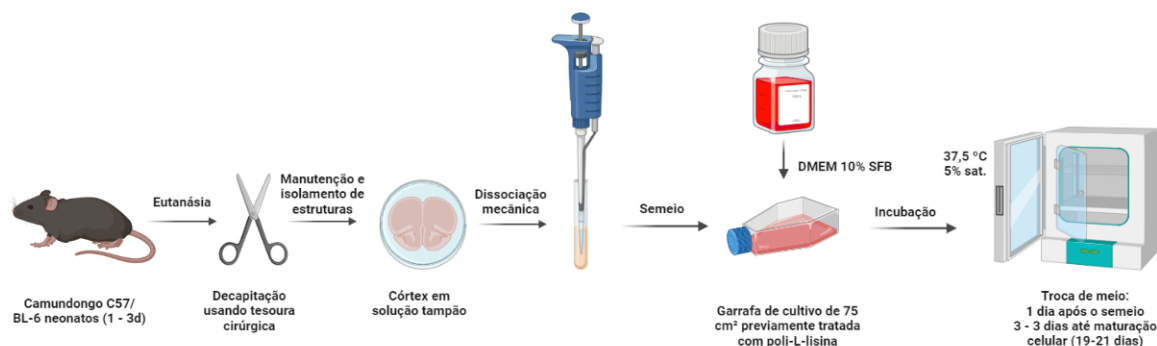
4.2.2. Metodologia aplicada para atender o **Objetivo específico 1**: Padronizar o protocolo de realização de culturas primárias de astrócitos corticais a partir de camundongos neonatos da linhagem C57/BL-6.

Para o atendimento do objetivo específico 1, os astrócitos corticais foram obtidos a partir de camundongo C57/BL-6 neonatos (1-3d), segundo o protocolo descrito em Schildge *et al.* (2003) com pequenas modificações. Brevemente, os animais foram eutanasiados por decapitação utilizando uma tesoura cirúrgica e o cérebro foi isolado e mantido em CMF (solução tampão livre de cálcio e magnésio; pH 7,4) gelado para manutenção da viabilidade celular. Posteriormente, o córtex foi isolado e as meninges e os vasos sanguíneos foram cuidadosamente removidos utilizando micro pinças. Os córtex foram então dissociados mecanicamente através de pipetagem contínua até não se observar grumos de tecido. As células obtidas a partir de 3 - 5 animais foram centrifugados (10 min; 300 g), contadas em câmara de Neubauer com o corante *trypan-blue* e semeadas (aproximadamente 25 milhões de células/garrafa) em meio DMEM/10% SFB em uma garrafa de cultivo de 75 cm² previamente tratada com poli-L-lisina, conforme descrito abaixo. As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% SFB (pH 7,6) e mantidas em incubadora sob condições de temperatura, concentração de CO₂ e umidade controladas, 37°C, 5% e saturação, respectivamente (incubadora *Thermo Scientific* 4131) (**Figura 5**). O meio das células foi trocado 1 dia após o semeio, e depois a cada 3 dias até a maturação celular, caracterizada pela formação de uma monocamada de astrócitos (19-21 dias). Durante o tempo de crescimento, entre os dias 7-8 foi realizado o *shake* das culturas (300 g durante 30 minutos a 37°C; *Orbital Shaker - Fisher Scientific*), a fim de separar a microglia da cultura, aumentando a pureza em astrócitos. O sobrenadante contendo a microglia ativada foi descartado. Após, foi adicionado 3 mL de tripsina durante 5 minutos, a fim de soltar os astrócitos do fundo da garrafa. A tripsina foi inativada com 10 mL de meio DMEM/10% SFB e a amostra foi

centrifugada (10 min; 300 g). Após, o volume foi dividido igualmente entre duas garrafas de cultivo de 75 cm² e mantidas novamente em incubadora (**Figura 6**).

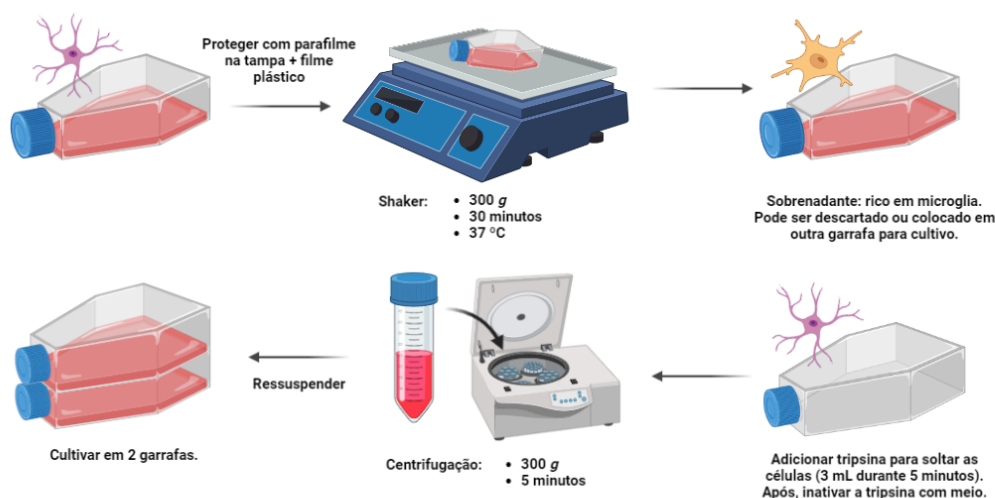
Preparo das garrafas com poli-L-lisina: primeiramente a poli-L-lisina (**Tabela 1**) foi aliquotada no volume de 1 mL em eppendorf de 1,5 mL e mantida sob refrigeração a -20 °C. Para cada garrafa de 75 cm², foi utilizada uma alíquota de poli-L-lisina diluída na proporção 1:1000 em água milli-Q. A garrafa foi mantida na incubadora durante 40 minutos e após esse tempo o volume foi retirado e a garrafa seca voltou para a incubadora até receber as células. Esse processo foi realizado no dia anterior ao dia da eutanásia.

Figura 5. Workflow do cultivo primário de astrócitos de camundongo C57/BL6. Baseado em Schildge et. al., 2013.



Fonte: Autoria própria, 2022 - adaptado de Bio Render.

Figura 6. Workflow do *shake* do cultivo primário de astrócitos de camundongo C57/BL-6. O *shake* deve ser realizado durante o 7º ou 8º dia do cultivo. Baseado em Schildge et. al., 2013.

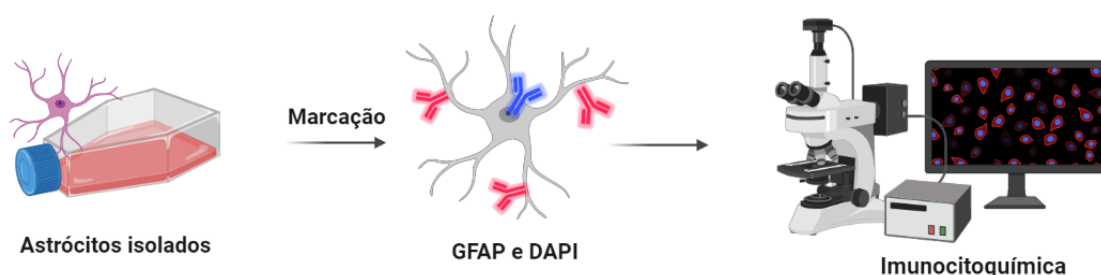


Fonte: Autoria própria, 2022 - adaptado de Bio Render.

4.2.3. Metodologia aplicada para atender o **Objetivo específico 2**: Realizar uma análise qualitativa do grau de pureza das culturas de astrócitos produzidas utilizando a proteína GFAP como marcador.

Após a padronização do método de isolamento, foi realizado o ensaio de imunocitoquímica, utilizando GFAP como marcador específico para astrócitos (**Figura 7**). Para esse ensaio, também foi utilizado o protocolo descrito em Schildge et. al (2003), com algumas modificações. Os astrócitos foram tripsinizados e semeados (100.000 células/*coverslip*) em *coverslips* de 15 mm de diâmetro previamente preparadas com poli-L-lisina e cultivados em meio DMEM/10% SFB por 72h. Após, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas 2x cuidadosamente com PBS e foram fixadas com PFA 4% tamponado durante 15 minutos. O PFA 4% foi removido, as células foram novamente lavadas 2x com PBS e foram submetidas ao protocolo de bloqueio com uma solução bloqueadora (7% SFB, 0,2% Tween 20 e qsp PBS) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após, foi realizada incubação com anticorpo primário *anti GFAP* (**Tabela 1**), diluído na proporção 1:100 *overnight*, a 4°C em câmara úmida. Após, as células foram lavadas 3x com PBS filtrado durante 10 minutos e foi adicionado o anticorpo secundário *anti-rabbit Alexa 555* (**Tabela 1**), diluído na proporção 1:500 durante 1 hora em temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas 3x com PBS filtrado durante 10 minutos e foi realizada a coloração com DAPI (**Tabela 1**), diluído na proporção 1:10.000 para marcação do núcleo celular. Novamente, as células foram lavadas com PBS filtrado 2x durante 10 minutos e foi realizada a montagem da lâmina utilizando *Fluoromount G* (**Tabela 1**). As lâminas foram armazenadas em câmara escura e fria até o momento da realização da captura das imagens realizada no microscópio Leica - modelo dm6b.

Figura 7. Workflow do cultivo primário de astrócitos e posterior análise do marcador GFAP pela técnica de imunocitoquímica.



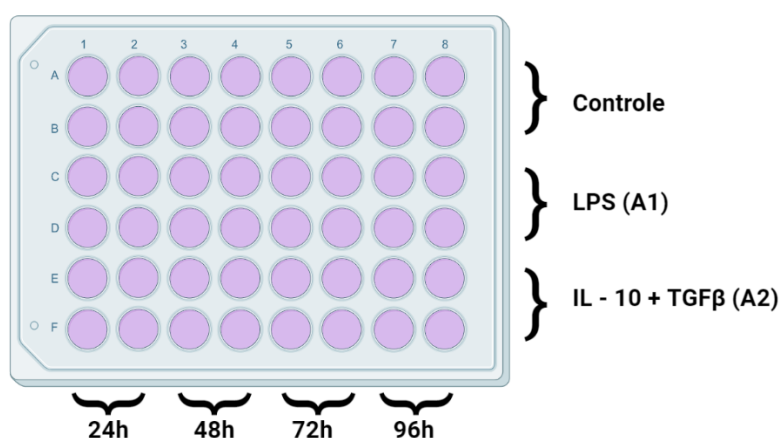
Fonte: Autoria própria, 2022 - adaptado de Bio Render

4.2.4. Metodologia aplicada para atender o **Objetivo específico 3**: Avaliar a viabilidade celular das culturas primárias de astrócitos frente a indução dos fenótipos A1 e A2, utilizando o tratamento com LPS e a combinação de TGF β e IL-10, respectivamente.

Os astrócitos obtidos a partir de cultivo primário de camundongos C57/BL-6 foram semeados em *converslips* (100.000 células/coverslip) durante 72h e então submetidos aos seguintes protocolos: i) administração de LPS (10ng/mL) para indução de perfil A1 durante 72h e ii) administração de IL-10 (10 ng/mL) + TGF beta (1 ng/mL), para indução de perfil A2. Os astrócitos foram então submetidos ao mesmo protocolo de imunocitoquímica já citado acima (item 4.2.4).

Para verificar a viabilidade celular, foram semeadas 20.000 células por poço em uma placa de 48 poços (**Figura 8**). As células cresceram na placa durante 72h e depois foram submetidas aos seguintes tratamentos, em quadruplicata: i) grupo controle: mantidos com DMEM/10% SFB, ii) administração de LPS (10 ng/mL) para indução de perfil A1 e iii) administração de IL-10 (10 ng/mL) + TGF beta (1 ng/mL) para indução do perfil A2. Então, foi realizado um ensaio de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Essa técnica permite avaliar a atividade das desidrogenases mitocondriais via redução da molécula de MTT em um sal insolúvel - cristal de formazan (Vistica, 1991). O ensaio foi realizado nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h para todos os grupos. A absorbância foi medida em 492 nm. Os dados foram expressos como absorbância (média $\pm$ desvio padrão). Os gráficos e a análise estatística foram realizados utilizando o programa *Prism GraphPad Software* (San Diego, USA).

Figura 8. Esquema de organização da placa de 48 poços para o ensaio de MTT.



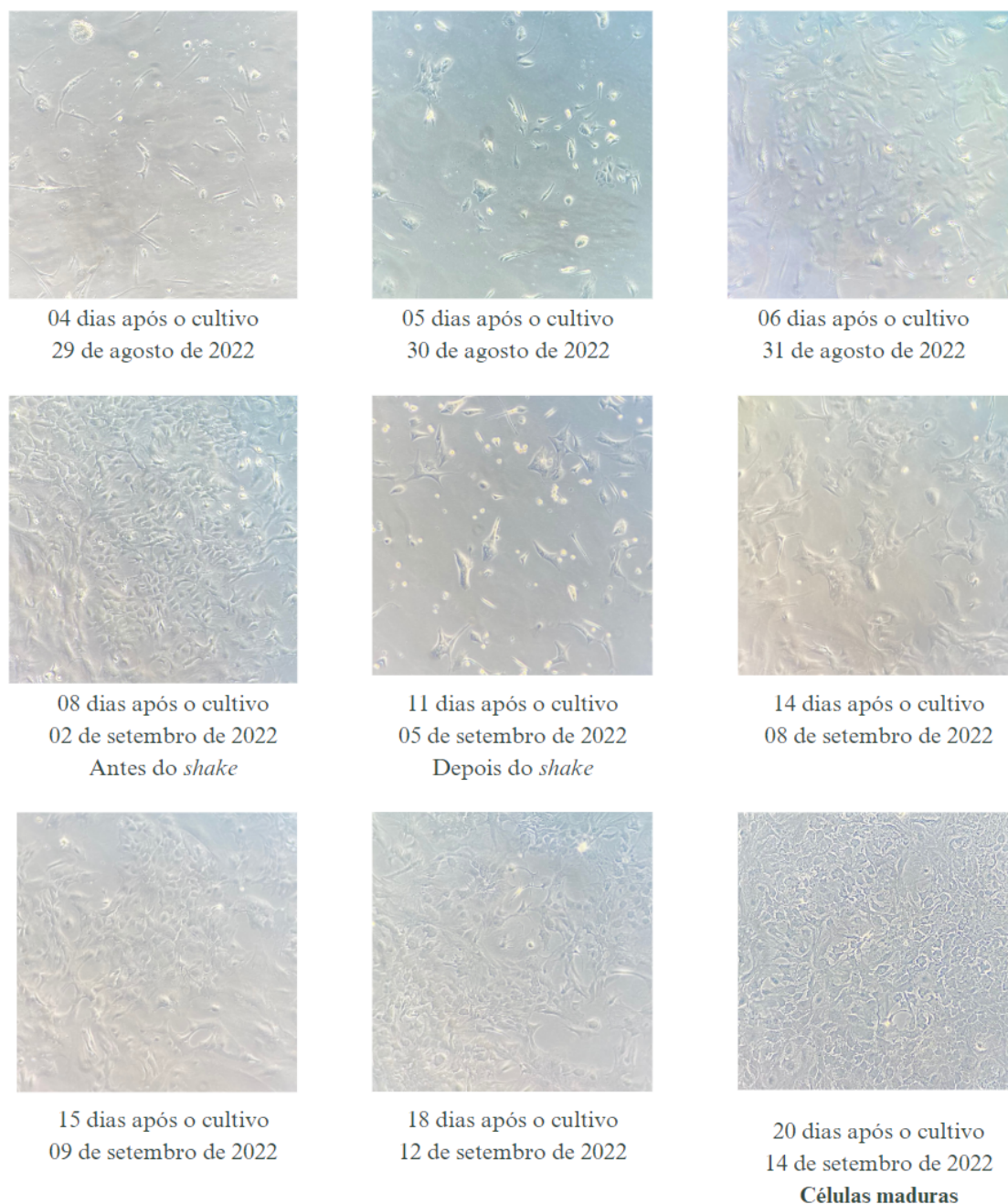
Fonte: Autoria própria, 2023 - adaptado de Bio Render

5. RESULTADOS

5.1. A padronização do protocolo de culturas primárias de astrócitos corticais a partir de camundongos neonatos da linhagem C57/BL-6 foi realizada com sucesso.

A **Figura 9** apresenta imagens representativas do desenvolvimento da cultura de astrócitos de camundongo desde o semeio das células até a maturação após 3 semanas de cultivo. Para este cultivo, foi utilizado a porção cortical de 5 animais neonatos (3 dias de vida). O cultivo foi realizado em garrafas de 75 cm² e a quantidade de células semeadas foi de aproximadamente $21,2 \times 10^6$, relativo ao rendimento total obtido após o isolamento. O *shake* foi realizado no sétimo dia. Ao atingir a maturidade (20 dias), as células foram tratadas e o restante foi devolvido à garrafa. Foi realizado acompanhamento pós semeio, no qual a duração da cultura foi de 49 dias (7 semanas). Ao final do tempo preconizado de cultivo (20 dias) foi possível observar a predominância de células com a morfologia característica de astrócitos, indicando a importância da etapa de *shake* para a remoção de microglia. Além disso, conclui-se que a etapa inicial de limpeza do tecido cortical (remoção de vasos sanguíneos e de meninges) foi realizada de forma assertiva, uma vez que a cultura não apresenta contaminação com fibroblastos.

Figura 9. Imagens representativas do cultivo de astrócitos primários de camundongos C57/BL-6 ao longo do tempo conforme indicado. Magnificação: 20x.



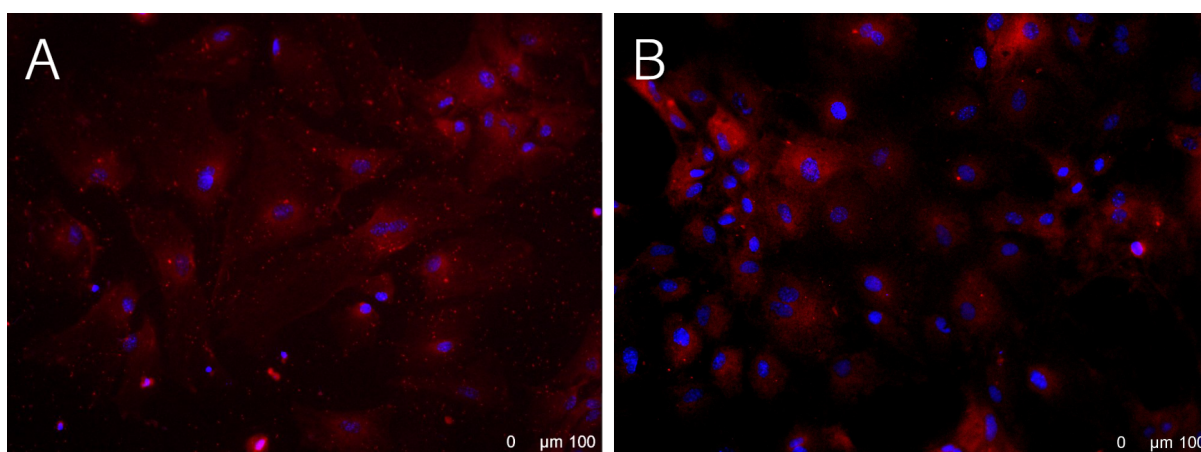
5.2. Análise qualitativa do grau de pureza das culturas de astrócitos produzidas utilizando a proteína GFAP como marcador.

Com o intuito de verificar o grau de pureza das culturas de astrócitos produzidas, realizamos experimentos de imunocitoquímica utilizando a proteína GFAP como marcador (**Figura 10**). Neste ensaio, foi possível observar os astrócitos presentes na cultura. A marcação com fluoróforo azul (DAPI) permite identificar a localização dos núcleos celulares e a marcação com fluoróforo vermelho (Alexa 555) indica onde há presença de GFAP, proteína que compõe o citoesqueleto dos astrócitos. Portanto, quando

observamos a presença de núcleos celulares marcados em azul acompanhados por uma rede de filamentos vermelhos, podemos presumir que essa cultura celular é majoritariamente composta por astrócitos. Esse dado, somado à observação morfológica das culturas obtidas (**Figura 9**) comprovam que o protocolo de padronização de cultivo primário de astrócitos foi implementado com sucesso e que o mesmo é reprodutível, constituindo uma ferramenta útil para a realização de estudos da participação dos astrócitos em diferentes contextos fisiopatológicos.

Figura 10. Análise da expressão de GFAP em cultura primária de astrócitos de camundongo C57/BL6.

Astrócitos primários semeados em *coverslips* e processados para análise da expressão de GFAP nos tempos de 24h em A e 48h em B. Citoesqueleto das células marcado com GFAP (*anti-rabbit Alexa 555*; vermelho) e o núcleo marcado em azul (DAPI). Magnificância: 20x.

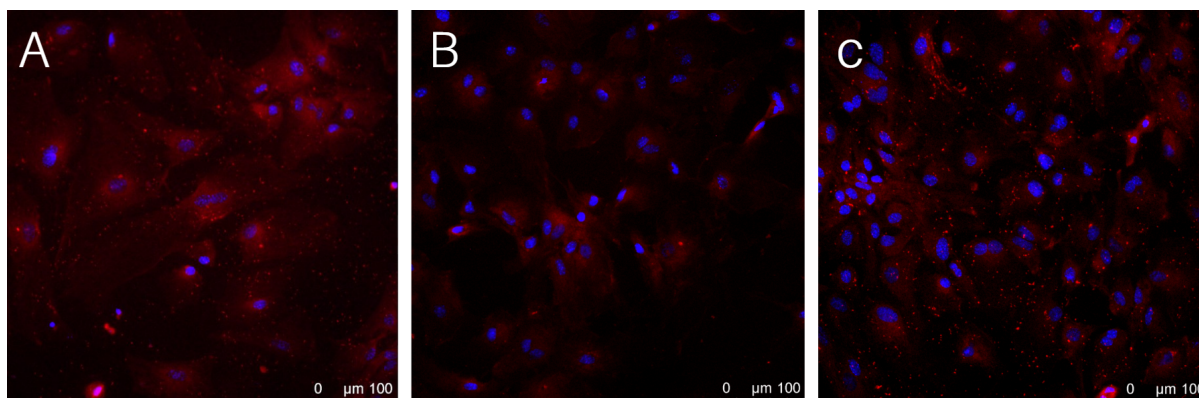


5.3 Avaliação da viabilidade celular das culturas primárias de astrócitos frente a indução dos fenótipos A1 e A2, utilizando o tratamento com LPS e a combinação de TGFβ e IL-10, respectivamente.

A partir da padronização da cultura de astrócitos, realizamos experimentos para determinar o impacto de indutores de polarização A1 e A2, LPS e TGFβ + IL-10 respectivamente, sobre a expressão de GFAP, indicador de reatividade astrocitária, e sobre a viabilidade celular. Para tal, as culturas de astrócitos foram semeadas em *coverslips* e estimuladas com LPS (10 ng/mL) e com TGFβ + IL-10 (1 ng/mL; 10 ng/mL respectivamente) e processadas para ICC para GFAP, conforme descrito na metodologia. A **Figura 11** mostra imagens representativas de expressão de GFAP em células controle e estimuladas com os referidos indutores de polarização A1 e A2. Apesar da marcação com GFAP estar presente em todos os grupos, não foi possível observar modificações morfológicas significativas entre os grupos ou aumento de expressão de GFAP nas células tratadas com LPS, conforme é descrito na literatura. Dessa forma, mais experimentos são

necessários para provar se os indutores de polarização A1 e A2 utilizados promovem modificações diferenciais na morfologia e/ou expressão de GFAP nos astrócitos.

Figura 11. Análise da expressão de GFAP em cultura primária de astrócitos de camundongo C57/BL6. Astrócitos primários semeados em *coverslips* e processados para análise da expressão de GFAP. Em A, grupo controle, em B, astrócitos tratados com LPS (10 ng/mL) e em C astrócitos tratados com TGF β (1 ng/mL) e IL-10 (10 ng/mL), todos no tempo de 24h. Células marcadas com GFAP (*anti-rabbit Alexa 555 - LifeTechnol* (A21428)). Magnificância: 20x.



Após a análise da viabilidade celular dos astrócitos foi realizada. As culturas foram semeadas em placas de 48 poços e tratadas com LPS (10 ng/mL) e com TGF β + IL-10 (1 ng/mL; 10 ng/mL) por tempos crescentes (24, 48, 72 e 96 h). Após, foi realizada a análise utilizando o ensaio do MTT, conforme descrito na metodologia. Células não tratadas e cultivadas em DMEM/10% SFB foram consideradas controle (**Figura 12** e **Figura 13**). Com o conjunto dos presentes resultados, foi possível avaliar a viabilidade celular frente aos tratamentos propostos. O ensaio de MTT permitiu visualizar que não existe diferença significativa em relação ao tempo de exposição ao tratamento (**Figura 12 - ANOVA de duas vias**) nem entre o grupo controle e os grupos tratados (**Figura 13 - ANOVA de uma via**). Sendo assim, a atividade das desidrogenases mitocondriais dos grupos tratados é preservada em relação ao grupo controle, o que indica que o tratamento proposto não compromete a viabilidade celular dos astrócitos em nenhum dos tempos estudados. Concomitantemente, na imunocitoquímica, foi possível visualizar que os astrócitos não apresentaram indícios de dano ou morte celular frente aos tratamentos.

Figura 12. Análise da viabilidade celular de astrócitos primários após o tratamento com LPS (10 ng/mL), TGF β (1 ng/mL) em combinação com IL-10 (10 ng/mL). A análise de MTT foi realizada nos tempos indicados. Experimento realizado em quadruplicata de um cultivo primário. Os resultados foram expressos como média da absorbância $\pm$ desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas através de Análise da variância (ANOVA) de duas vias seguido do *post-hoc* de Tukey considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

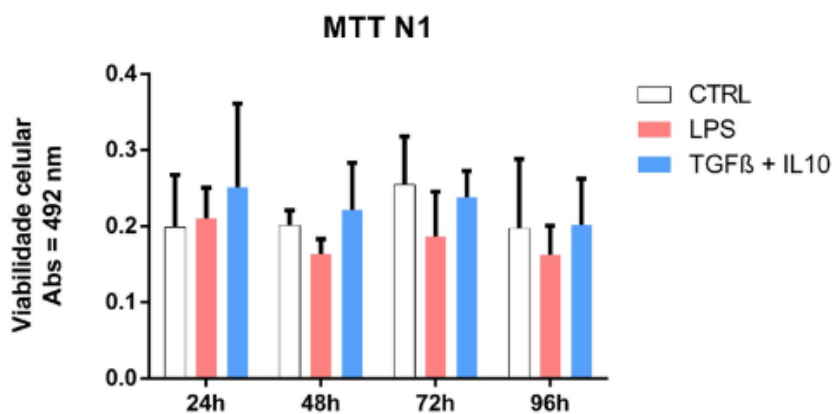
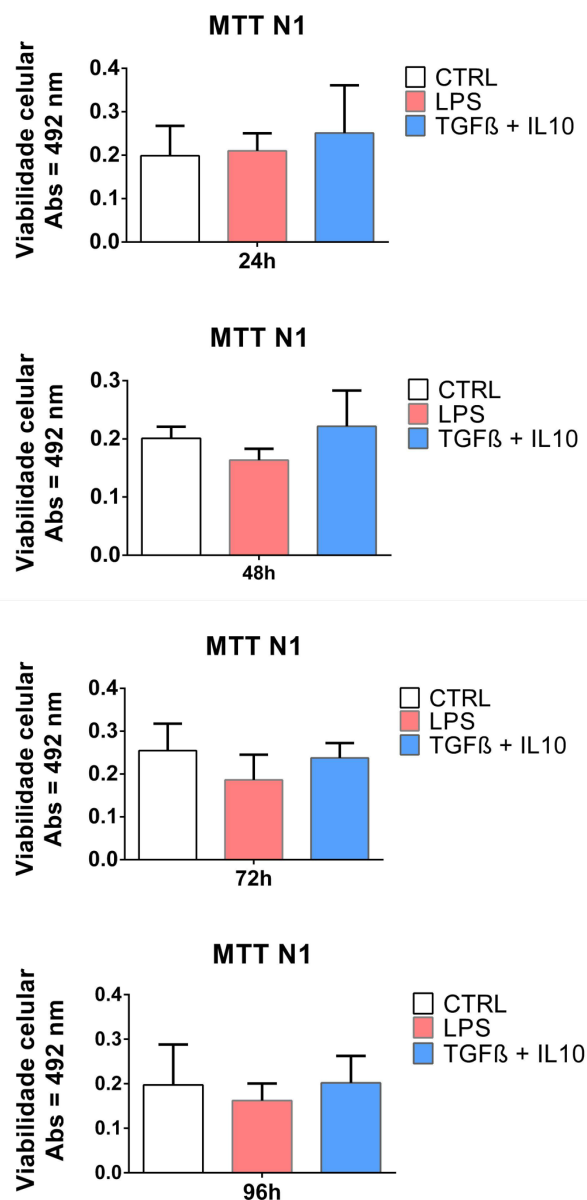


Figura 13. Análise da viabilidade celular de astrócitos primários após o tratamento com LPS (10 ng/mL), TGF β (1 ng/mL) em combinação com IL-10 (10 ng/mL). A análise de MTT foi realizada nos tempos indicados. Experimento realizado em quadruplicata de um cultivo primário. Os resultados foram expressos como média da absorbância $\pm$ desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas através de Análise da variância (ANOVA) de uma via seguido do *post-hoc* de Tukey considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.



Anexo IV: Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Rua Sarmento Leite, 245 - Fones: 0 xx 51 3303 9000 - Fax: 0 xx 51 3303.8810
CEP 90050-170 - Porto Alegre - RS - www.ufcspa.edu.br

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 261/19

Parecer 653/19

2) DATA DO PARECER: 11 de setembro de 2019

3) TÍTULO DO PROJETO:

Análise da participação da sinalização purinérgica na polarização pró- ou anti-inflamatória de astrócitos associados ao tumor.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Elizandra Braganhol

5) RESUMO DO PROJETO:

Busca o melhor entendimento da progressão tumoral do glioblastoma (GBM) para estabelecer novas frentes de tratamento. O sistema purinérgico é descrito como uma potencial via envolvida na progressão e malignidade de tumores. Investigar o papel do sistema purinérgico na polarização de astrócitos na progressão do GBM. Levando em consideração a influência da relação astroócito-glioma no microambiente tumoral.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Avaliar se a interação entre astrócitos reativos do microambiente tumoral, principalmente os do fenótipo A2, e as células do glioma tem a capacidade de induzir um processo de progressão tumoral baseado na maior formação de adenosina.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

☐

Ensino

☒

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

☒

Adequado

☐

Comentários

Introdução

☒

Adequada

☐

Comentários

Objetivos

☒

Adequados

☐

Comentários

Relevância e Justificativa

☐

Adequados

☐

Comentários

Materiais e Métodos

☐

Adequados

☐

Comentários

Cronograma para execução da pesquisa

☒

Adequado

☐

Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
Rua Sarmento Leite, 245 - Fones: 0 xx 51 3303 9000 - Fax: 0 xx 51 3303.8810
CEP 90050-170 - Porto Alegre - RS - www.ufcspa.edu.br

Orçamento e fonte financiadora

☒ Adequados ☐ Comentários

Referências Bibliográficas

☒ Adequadas ☐ Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

☒ Sim ☐ Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B ☐ C ☐ D ☐ E ☐

Justifique:

Espécie: Camundongo isogênico C57/BL-6

Número Amostral: 120

Redução Amostral:

☐ Sim ☒ Não

Justifique:

Substituição de Metodologia:

☐ Sim ☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:

☐ Sim ☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais:

☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais:

☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável):

☐ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável):

☐ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
Rua Sarmento Leite, 245 - Fones: 0 xx 51 3303 9000 - Fax: 0 xx 51 3303.8810
CEP 90050-170 - Porto Alegre - RS - www.ufcspa.edu.br

Eutanásia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Decaptação

Local de Realização (Biotério/Labotatório):
Biotério da UFCSPA.

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
1 a 3 dias	C57/BL-6	Machos	120

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

- ☒ Aprovado
☐ Com Pendência
☐ Não aprovado

Data de início: julho de 2019 Data de Término: junho de 2023

Comentários gerais sobre o projeto:

Formulário:

Corrigir a data de inicio do projeto.

O CEUA sugere o uso de camundongos fêmeas para alcançar o n da amostra mais rapidamente.

Anexo V: Currículo Lattes

10/03/2024, 11:55

Currículo Lattes

Imprimir
currículo

Gabriela Nogueira Debom

Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/1082007701338280>

Última atualização do currículo em: 10/03/2024

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (2013) e mestrado em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas (2016). Tem experiência na área de Biologia Geral, Bioquímica e Biotecnologia. Atuou como Bolsista de Iniciação Científica (2011-2013) no Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer - NEUROCAN, trabalhando com desenvolvimento de pesquisas relacionadas aos temas de enzimologia, cultivo celular, patologias envolvendo o sistema inflamatório e câncer. Atualmente realiza doutorado em BioCiências na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), com o título "Análise da participação da sinalização purinérgica na polarização pró- ou anti-inflamatória de astrócitos associados ao tumor". Durante o período de setembro de 2021 a setembro de 2022 realizou doutorado sanduiche na University of Pittsburgh, financiado pelo programa PDSE/Capes.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome: Gabriela Nogueira Debom

Dados pessoais

Filiação: Aroldo Debom e Maria Laura Nogueira Debom

Nascimento: 09/03/1993 - Pelotas/RS - Brasil

Carteira de Identidade: 3087289314 SSP - RS - 10/12/2008

CPF: 022.036.530-00

Endereço residencial: Avenida Lageado, 721 - apartamento 202
Pelópolis - Porto Alegre
90490-110, RS - Brasil
Telefone: 53 996076480
Celular: 53 996076480Endereço eletrônico: E-mail para contato: gabriela.debom@gmail.com
E-mail alternativo: gabdebon@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2019** Doutorado em BIOCIÊNCIAS.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
com período sanduiche em University of Pittsburgh (Orientador: Prof. Dr. Gary Kishanbeah)
Título: Análise da participação da sinalização purinérgica na polarização pró- ou anti-inflamatória de astrócitos associados ao tumor
Orientador: Profa Dra Elizandra Braganhol
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2014 - 2016** Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção.
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
Título: Efeitos do estresse de miúdo em parâmetros comportamentais, bioquímicos e de estresse oxidativo em animais submetidos a um modelo experimental de marfan, Ano de obtenção: 2016
Orientador: Roseli Maria Spanevello
Co-orientador: Marta Gasal
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2010 - 2013** Graduação em Biotecnologia.
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
Título: Avaliação dos níveis séricos de transglutaminase e atividade da adenosina deaminase em estríctos e infôlidos do portadores de Síndrome de Down
Orientador: Roseli Maria Spanevello

Formação complementar

- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Minicurso de Biotecnologia e Experimentação Animal. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Téc. para Coleta de Secreções. (Carga horária: 30h).
TELELAB, TELELAB, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Aspectos Teór. e Prátic. da Experimentação Animal. (Carga horária: 6h).
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
- 2010 - 2010** Extensão universitária em Mural G-Síntese. (Carga horária: 108h).
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Cultivo Celular e Engenharia Tecidual. (Carga horária: 6h).
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
- 2010 - 2010** Biosseg. em Unid. Hemoteráp. e Lab. de Saúde Públ... (Carga horária: 30h).
TELELAB, TELELAB, Brasil

10/03/2024, 11:55

Currículo Lattes

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Vínculo
Institucional

- 2014 - 2016** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestreando - CAPES, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Atuando no Laboratório de Neuroquímica, Infecção e Câncer.
- 2011 - 2013** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica - PIBIC CNPq, Regime: Parcial
Outras informações:
Atuando como estagiária nos Laboratórios de Cultivo Celular e Neuroquímica, Infecção e Câncer, além de ter projeto intitulado "Avaliação de chalconas sintéticas na atividade da enzima NTPDase de linfócitos de ratos".

2. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo
Institucional

- 2021 - 2021** Vínculo: Voluntário, Enquadramento funcional: Ação no enfrentamento da COVID-19, Carga horária: 80, Regime: Integral
Outras informações:
Ação voluntária desenvolvida na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, no Controle de Acesso - rotatividade entre hospitais (HSF, HSF, HSA e HSJ); desenvolvimento, entre outras, as seguintes atividades: - Monitoração de temperatura; - Verificação de sintomas gripais; - Orientações básicas quanto à higienização das mãos e uso de máscaras.
- 2019 - Atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Doutoranda, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

Projetos

Projetos de
pesquisa

- 2019 - Atual** **Microambiente tumoral: Avaliação da participação dos astrócitos na progressão dos gliomas.**
Descrição: A atividade astrocítica é a resposta universal dos astrócitos frente a injúrias cerebrais e patologias diversas, como trauma, infecção, neurodegeneração e leiquemia. Todavia, essa condição vem sendo associada também a tumores, pela participação do astrócito no microambiente tumoral. Astrócitos não-neoplásicos ao redor do tumor podem sofrer ativação pelo microambiente tumoral, e assim secretar diversas moléculas – como as citocinas e fatores de crescimento – que facilitam a progressão, agressão e sobrevivência de tumores. O Glioblastoma (GB) é a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral primário, tendo seu prognóstico extremamente desanimador devido a resistência à maioria dos fármacos citotóxicos existentes no mercado e também à radioterapia. Logo, estudos que busquem o melhor entendimento da progressão tumoral são interessantes para que se possa estabelecer novas frentes no seu tratamento. Nesse contexto, o sistema purinérgico é descrito como uma potencial via envolvida na progressão e multiplicidade de tumores. Em especial, o aumento da expressão de ecto-5'-NTPDase, enzima responsável pela degradação de AMP extracelular em adenosina, e da disponibilidade de adenosina em diferentes tipos de tumores, incluindo o GBM, está relacionado ao crescimento tumoral, angiogênese, formação de metástases, escape da vigilância imunológica e a quimiorresistência. O intuito desse projeto é investigar o papel do sistema purinérgico na polarização (A1 e A2) de astrócitos na progressão do glioblastoma, levando em consideração a influência da relação astrócito-glioma no microambiente tumoral.
Situação: Em andamento Natureza: Projeto de pesquisa
Alunos envolvidos: Doutorado (1);
Integrantes: Gabriela Nogueira Debon; Elizandra Braganhol (Responsável)
- 2012 - 2014** **ANÁLISE DO SISTEMA PURINÉRGICO EM ANIMAIS EXPOSTOS AO ESTRESSE CRÔNICO VARIANDO ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS**
Descrição: Objetivo Geral: Avaliar as atividades E-NTPDases e de ecto-5'-nucleotídeos em sinaptossomos de córtex cerebral de ratos submetidos ao estresse crônico variável. Além disso, avaliaremos respostas nociceptiva, inflamatória, antidepressiva e comportamental desses animais 24 h após a última sessão de estresse. Objetivos Específicos: a) Verificar se a exposição ao estresse crônico influencia a atividade das E-NTPDases e de ecto-5'-nucleotídeos em sinaptossomos de córtex cerebral b) Determinar os níveis de enzimas antioxidantes e estresse oxidativo (medido através da determinação da concentração de malondialdeído, catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase) do SNC no córtex; c) Avaliar a resposta nociceptiva em animais submetidos ao estresse crônico variável; d) Avaliar o comportamento dos animais na tarefa de Campo Aberto.
Situação: Em andamento Natureza: Projeto de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (3);
Integrantes: Gabriela Nogueira Debon; Giovana Duzzo Gamaro (Responsável); Elizandra Braganhol; Rosália Spanavello; Adriana Lourenço da Silva; Inaci Lucena da Silva Torres; Alina Longo; Karen de Souza da Silva
- 2012 - 2014** **Estudo do perfil oxidativo e avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de portadoras com síndrome de Down.**
Descrição: Verificar as alterações na atividade das enzimas NTPDase e adenosina desaminase em linfócitos de pacientes portadoras da Síndrome de Down e indivíduos saudáveis. - Determinar a atividade das enzimas NTPDase, 5'- nucleotídeo e adenosina desaminase em plaquetas de pacientes portadoras da Síndrome de Down e indivíduos saudáveis. - Analisar o perfil de agregação plaquetária de portadoras de síndrome de Down. - Analisar a expressão da enzima NTPDase em plaquetas e linfócitos de portadoras da síndrome de Down e indivíduos saudáveis. - Determinar a concentração de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina no soro de pacientes portadoras da Síndrome de Down e indivíduos saudáveis. - Analisar o estado das defesas antioxidantes e estresse oxidativo através da determinação dos níveis de SOD, catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase (GPx) em sangue de portadoras de Síndrome de Down. - Analisar a intensidade das lesões biológicas causadas pelos radicais livres através da dosagem de malondialdeído (MDA) e da determinação da carbonilação protéica em soro de pacientes portadoras da Síndrome de Down e do grupo controle.
Situação: Em andamento Natureza: Projeto de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (4); Mestrado acadêmico (2);
Integrantes: Gabriela Nogueira Debon; Giovana Duzzo Gamaro; Elizandra Braganhol; Rosália Spanavello (Responsável); Karen de Souza da Silva; William Pires; Gilberto Garcia; Maria Rosa Chistolina Scheltinger; Carla Delmas; Rodrigo Rodrigues; Elita Ferreira da Silveira; Jossé Maria da Costa; Augusto Natori Geluzo
- 2011 - 2013** **ANÁLISE DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE INIBIDORES DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 PARA O TRATAMENTO DE TUMORES**
Descrição: O objetivo geral dessa proposta é investigar o potencial terapêutico do inibidor seletivo da ecto-5'-NT/CD73, APCP (α,β-metileno-ADCP), e de formulações em lipossomos contendo sequências de RNA de interferência para ecto-5'-NT/CD73 sobre a proliferação in vitro dos gliomas.
Situação: Em andamento Natureza: Projeto de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (2);
Integrantes: Gabriela Nogueira Debon; Elizandra Braganhol; Rosália Spanavello (Responsável); Karen de Souza da Silva; Maria Rosa Chistolina Scheltinger; Rodrigo Rodrigues; Elita Ferreira da Silveira; Ana M. O. Balduino
- 2011 - 2014** **Avaliação de chalconas sintéticas como agentes antitumorais e imunomoduladores**

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvcv.trata

2/6

	Descrição: O objetivo do presente projeto é avaliar, através de estudos in vitro, a ação antitumoral de derivados sintéticos das chalconas, bem como o mecanismo de ação destes compostos. Ademais, avaliar o papel in vivo e in vitro destes compostos como agentes imunomoduladores através da determinação da atividade de esterase e da apoptose em linfócitos de ratos. Metas: a) Avaliar a citotoxicidade de chalconas sobre linhagens celulares humanas; b) Avaliar a expressão gênica da caspase 9, p53, p21, Bcl-2 e Bax em diferentes linhagens celulares; c) Determinar o efeito in vitro de diferentes chalconas sobre as atividades das enzimas NTPase e adenosina desidrase em linfócitos de ratos; d) Determinar o efeito in vitro de diferentes chalconas sobre a atividade da AChE em linfócitos de ratos; e) Avaliar, in vivo, o efeito de diferentes chalconas sobre as atividades de esterase e AChE em linfócitos de ratos. Situação: Em andamento Natureza: Projeto de pesquisa Alunos envolvidos: Graduação (1); Integrantes: Gabriela Nogueira Debon; Rosália Spanevello; Althea Gatto Barschak (Responsável); Francisco Moro Stefanelli; Tiago Collares
2011 - 2013	ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA PROGRESSÃO DOS GLIOMAS
	Descrição: Objetivo Geral: Investigar o envolvimento das E-NTPases e dos receptores purinérgicos na modulação da resposta inflamatória em gliomas. Situação: Em andamento Natureza: Projeto de pesquisa Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (2); Integrantes: Gabriela Nogueira Debon; Eliana Braganhol (Responsável); Rosália Spanevello; Karen de Souza da Silva; Rodrigo Rodrigues; Eliana Ferreira da Silva; Fatima Terezinha Beira; Francisco Del Pino; Ana M. O. Batistini
Projeto de extensão	
2012 - 2012	Mural G-Biotec em ação
	Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Gabriela Nogueira Debon; Luciana Bocca Dade (Responsável)
2012 - 2012	Mural G-Biotec
	Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Gabriela Nogueira Debon; Luciana Bocca Dade (Responsável)
2012 - 2012	Mural CIEP-Biotec: Biotecnologia invade a escola
	Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Gabriela Nogueira Debon; Luciana Bocca Dade (Responsável)
2010 - 2010	Mural G-Biotec
	Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Gabriela Nogueira Debon; Luciana Bocca Dade (Responsável)

Áreas de atuação

- 1. Biologia Geral
- 2. Bioquímica
- 3. Biologia Molecular

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem
Espanhol	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Razoavelmente
Português	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. [DOI](#) GELSLEICHTER, NICOLLY ESPINDOLA; DE SOUZA, PRESILA OLIVEIRA; TEIXEIRA, FERNANDA CARDOSO; DEBOM, GABRIELA NOGUEIRA; LENZ, GABRIELA SPES; ROLANO, GABRIELA GONÇALVES; DE CÁSSIA SANTANA, RITA; VISIOLI, FERNANDA; FACHEL, FLÁVIA NATHIELY SILVEIRA; MICHELS, LUANA ROBERTA; AZAMBUJA, JULIANA HOFSTÄTTER; TEIXEIRA, HELDER FERREIRA; [BRAGANHOL, ELIZANDRA](#)
Metastatic Melanoma: A Preclinical Model Standardization and Development of a Chitosan-Coated Nanosuspension Containing Temozolomide to Treat Brain Metastasis. CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY. [DOI](#) v.43, p. 2909 - 2961, 2023.

2. [DOI](#) DEBOM, GABRIELA N.; RUSENICH, DOMINIQUE S.; [BRAGANHOL, ELIZANDRA](#)
Adenosinergic Signaling as a Key Modulator of the Glioma Microenvironment and Reactive Astrocytes. Frontiers in Neuroscience. [DOI](#) v.16, p.648476 -, 2022.

3. [DOI](#) SOARES, MAYARA SANDRIELLY PEREIRA; ZANUSSI COSTA, MARCELO; DA SILVA, TATIANE MORGANA; GAZAL, MARTA; COUTO, CARLOS AUGUSTO TAVARES DO; NOGUEIRA DEBOM, GABRIELA; RODRIGUES, RODRIGO; HOFSTÄTTER AZAMBUJA, JULIANA; ANDRÉ CASALI EMBERSON; MORITZ, CESAR EDUARDO JACINTHO; PRESILIA DUARTE; MARTA; [BRAGANHOL, ELIZANDRA](#); MORO STEFANELLO, FRANCIELI MARIA SPANEVELLO; ROSELIAMARIA
Methionine and/or Methionine Sulfonide Alter Ectoenzymes Activities in Lymphocytes and Inflammatory Parameters in *Sapientia* from Young Rats: Acute and Chronic Effects. CELL BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS. [DOI](#) v.76, p.243 - 253, 2016.

4. [DOI](#) SOARES, MAYARA SANDRIELLY PEREIRA; OLIVEIRA, PATRÍSCA SOUTO; DEBOM, GABRIELA NOGUEIRA; DA SILVA MATTOS, BRUNA; POLACHINI, CARLA ROBERTA; BALDESARELLI, JUCIMARA; MORSCH, VERA MARIA; SCHEITINGER, MARIA ROSA CHITOLINA; TAVARES, REJANE GIACOMELLI; STEFANELLO, FRANCIELI MORO; SPANEVELLO, ROSELIAMARIA
Chronic administration of methionine and/or methionine sulfonide alters oxidative stress parameters and ALAO activity in liver and kidney of young rats. AMINO ACIDS (WILEY-INTERSCIENCE). [DOI](#) v.49, p.129 - 138, 2017.

5. [DOI](#) GOEDERT, LUCAS; PLAÇA, JESSICA; NUNES, EMILY; DEBOM, GABRIELA; ESPERAFICO, ENILZA
Long Noncoding RNAs in HPV-Induced Oncogenesis. Advances in Tumor Virology. -, v.6, p.1 - 9, 2016.

6. [DOI](#) DEBOM, G. N.; GAZAL, MARTA; SOARES, MAYARA SANDRIELLY PEREIRA; DO COUTO, CARLOS AUGUSTO TAVARES; MATTOS, BRUNA; LENCINA, CLAYTON; KASTER, MANUELLA PINTO; GHISLENI, GABRIELE CODENONZI; TAVARES, REJANE; BRAGANHOL, E. CHAVES, VITOR CLASEN; REGINATTO, FLAVIO HENRIQUE; STEFANELLO, FRANCIELI; SPANEVELLO, ROSELIAMARIA
Preventive effects of blueberry extract on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine. Brain Research Bulletin. [DOI](#) v.127, p.292 - 299, 2016.

7. [DOI](#) FERREIRA, MAURÍCIO; RODRIGUES, RODRIGO; MOTTA, ELISE; DEBOM, GABRIELA; SOARES, FABIANO; DE MATTOS, BRUNA DA SILVA; MACHADO, CAROLINE; [STEFANELLO,](#)

FRANCIELI MORA; DA SILVA, TATIANE MORGANA; MARTINS, CAROLINE CURRY; DALENGARE, DIESSICA; MORSCH, VERA MARIA; BRAGANHOL, ELIZANDRA; SPANEVELLO, ROSELI MARIA. Evaluation of extracellular adenosine nucleotides hydrolysis in platelets and biomarkers of oxidative stress in Down syndrome individuals. *Biochemistry & Pharmacotherapy*. **433**, v.74, p.250 - 255, 2015.

8.  RODRIGUES, RODRIGO; DEBOM, GABRIELA; SOARES, FABIANO MACHADO; CAROLINE; PUREZA, JESSICA; PERES, WILLIAM; DE LIMA GARCIA, GILBERTO; DUARTE, MARTA FRESCURA; SCHETINGER, MARIA ROSA CHITOLINA; STEFANELLO, FRANCIELI; BRAGANHOL, ELIZANDRA; SPANEVELLO, ROSELI. Alterations of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in lymphocytes of Down syndrome subjects: Relation with inflammatory parameters. *Clinica Chimica Acta (Print)*. **433**, v.433, p.105 - 119, 2014.

9.  SILVEIRA, ELITA F.; CHASSOT, JANAINE M.; TEIXEIRA, FERNANDA C.; AZAMBUJA, JULIANA H.; DEBOM, GABRIELA; BEIRA, FÁTIMA T.; PINO, FRANCISCO A. B.; LOURENÇO, ADRIANA; HORN, ANA P.; CRUZ, LETICIA; SPANEVELLO, ROSELI M.; BRAGANHOL, ELIZANDRA. Kelatoprol-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. *Investigational New Drugs*. **33**, v.31, p.1424 - 1436, 2013.

Capítulos de livros publicados

1. KREMER, F.; DEBOM, G. N.; PLACA, J. R.; SOUZA, J.; GOEDERT, L.; NUNES, E. Banco de Dados Forenses In: *Biocienciologia Forenses*. 1 ed/Pelotas: Editora UFPel, 2014, p. 9-33.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SOARES, M.; DEBOM, G. N.; OLIVEIRA, Patrícia; COUTO, C. A. T.; TAVARES, R.; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, ROSELI. Avaliação da administração crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido em parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo de ratos jovens In: 14ª Mostra de Pós-Graduação (Salão Universitário UCPel), 2015, Pelotas. *Anais da 14ª Mostra de Pós-Graduação*, 2015.
2. SOARES, M.; DEBOM, G. N.; COUTO, C. A. T.; PUREZA, JESSICA; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, ROSELI. EFFECT OF ACUTE AND CHRONIC TREATMENT WITH METHIONINE AND/OR METHIONINE SULFOXIDE ON ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN LYMPHOCYTES FROM YOUNG RATS In: 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz de Iguaçu. *Anais do 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)*, 2015.
3. DEBOM, G. N.; GAZAL, M.; SOARES, M.; DE MATOS, BRUNA DA SILVEIRA; TAVARES, R.; STEFANELLO, F. M.; GHISLENI, G.; LENCINA, C.; SPANEVELLO, ROSELI. EFFECT OF BLUEBERRY EXTRACT IN OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN HIPPOCAMPUS OF RATS SUBMITTED TO AN EXPERIMENTAL MODEL OF MANIA In: 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz de Iguaçu. *Anais do 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)*, 2015.
4. COUTO, C. A. T.; AZAMBUJA, J. H.; DEBOM, G.; TEIXEIRA, F. C.; SPANEVELLO, Roseli Maria; BRAGANHOL, E. Direct signaling between astrocytes and glomas cells increases iNOS and ectonucleotidases activities. In: *Purines 2014*, 2014, Bonn. *Purines 2014*, 2014.
5. TEIXEIRA, F. C.; SILVEIRA, E. F.; AZAMBUJA, J. H.; DEBOM, G.; CRUZ, LETICIA; SPANEVELLO, Roseli Maria; BRAGANHOL, E. Kelatoprol-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth and modulate extracellular ATP metabolism in lymphocytes in a preclinical model of glioblastoma multiforme. In: *Purines 2014*, 2014, Bonn. *Purines 2014*, 2014.
6. PUREZA, J.; COSTA, M. Z.; SILVA, T. M.; DEBOM, G. N.; SOARES, F.; BRAGANHOL, E.; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, R. Acute Treatment with methionine and/or methionine sulfoxide modulates the NTPDase activity from rat lymphocyte In: 4th Brazilian Purine Club Meeting, 2013, Canelã. *Anais do 4th Brazilian Purine Club Meeting*, 2013.
7. COUTO, C. A. T.; BRAGANHOL, E.; TEIXEIRA, F. C.; DEBOM, G. N.; AZAMBUJA, J. H. Alterações na atividade da iNOS e das ectonucleotidases em astrócitos tratados com meio condicionado e cocultivados com gloma C6 In: V Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2013, Bagé. *Anais do V Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 2013.
8. MOTTA, E.; FERREIRA, M.; GIOVANNINI, F.; DEBOM, G. N.; PERES, W.; ORCY, R.; BRAGANHOL, E.; SPANEVELLO, R. Effect of Passive exercise on ectonucleotidase activity in platelets from ischemic patients hospitalized on intensive unit therapy In: 4th Brazilian Purine Club Meeting, 2013, Canelã. *Anais do 4th Brazilian Purine Club Meeting*, 2013.
9. AZAMBUJA, J. H.; SILVEIRA, E. F.; CHASSOT, J.; TEIXEIRA, F. C.; NOGUEIRA DEBOM, GABRIELA; HORN, A.; CRUZ, LETICIA; SPANEVELLO, ROSELI; BRAGANHOL, E. Kelatoprol-loaded nanocapsules inhibit in vivo tumor growth and modulate ectonucleotidase activities in lymphocytes from glioma implanted rats In: 4th Brazilian Club Meeting - Perspectives of Purinergic Signaling: from structures to functions and translational research, 2013, Canelã. *4th Brazilian Club Meeting - Perspectives of Purinergic Signaling: from structures to functions and translational research*, 2013.
10. DEBOM, G. N.; SILVA, T. M.; COSTA, M. Z.; AZAMBUJA, J. H.; RAMOS, P. T.; TEIXEIRA, F. C.; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, R.; BRAGANHOL, E. Methionine and Methionine sulfoxide treatment induces M1 macrophage polarization and modulates ectonucleotidase activities In: 4th Brazilian Purine Club Meeting, 2013, Canelã, RS. *Anais do 4th Brazilian Purine Club Meeting*, 2013.
11.  SOARES, F.; RODRIGUES, R.; DEBOM, G. N.; MACHADO, C.; PERES, W.; BRAGANHOL, E.; SPANEVELLO, R. The activity of NTPDase and Adenosine Deaminase is altered in lymphocyte and serum of down syndrome patients In: 4th Brazilian Purine Club Meeting, 2013, Canelã. *Anais do 4th Brazilian Purine Club Meeting*, 2013.
12. SILVEIRA, E. F.; RIBAS, D. A.; CHASSOT, J.; TEIXEIRA, F. C.; DEBOM, G. N.; LONGO, A.; SILVA, K. S.; SPANEVELLO, R.; CRUZ, L.; BRAGANHOL, E. Celatoprol em formulação de nanocapsulas reduz a viabilidade de glomas em cultura. In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia. *Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE*, 2012.
13.  DEBOM, G. N.; BRAGANHOL, E.; GAMARO, G. D.; PEREIRA, C.; SILVEIRA, E. F.; TEIXEIRA, F. C.; SILVA, K. S.; SCHMATZ, R.; SPANEVELLO, R. Efeito in vitro das chalconas na atividade da NTPDase de linfócitos de ratos In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia. *Anais da XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE*, 2012.
14. DEBOM, G. N.; NUNES, E.; PLACA, J. R.; GOEDERT, L.; GABOARDI, G.; PEREIRA, J. L.; KJARKE, G. B.; GONCALVES, C. X.; BRUM, C. B.; VASCONCELOS, F. A.; PINTO, V. S.; DODE, L. B. MURAL, O-BIOTEC In: 19º Congresso de Iniciação Científica UCPel, 2016, Pelotas. *Anais do 19º Congresso de Iniciação Científica UCPel*, 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. DEBOM, G. N.; COUTO, C. A. T.; SOARES, M.; RODRIGUES, R.; SPANEVELLO, ROSELI. Avaliação da níveis séricos de imunoglobulinas e da atividade da adenosina desaminase em eritrócitos e linfócitos de portadoras de síndrome de down In: XVII Encontro de Pós-Graduação UFPel, 2015, Pelotas. *Anais do XVII Encontro de Pós-Graduação UFPel*, 2015.

2. SILVA, D. S.; SILVA, C. E. H.; SOARES, M. S.; SPANEVELLO, Roseli Maria; CUNICO FILHO, W.; DEBOM, GABRIELA
Análise do efeito de 4-isozolidonas derivadas do 4-metilfenilacetato e do 4-metilsulfonilacetato na atividade da acetilcolinesterase em linfócitos de ratos. In: XVII ENPOS - Encontro da Pós-Graduação UFPEL, 2015, Pelotas.
Anais de 2015, 2015.
3. SOARES, M.; DEBOM, G. N.; OLIVEIRA, Patrícia; TAVARES, R.; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, ROSELIA
Efeito da administração crônica de metionina e/ou metionina sulfóxido sobre parâmetros bioquímicos séricos e de estresse oxidativo em fígado de ratos jovens. In: XVII Encontro de Pós-Graduação UFPEL, 2015, Pelotas.
Anais do XVII Encontro de Pós-Graduação UFPEL, 2015.
4. DE MATTOS, BRUNA DA SILVEIRA; DEBOM, G. N.; SOARES, M.; LENCINA, C.; GAZAL, M.; SPANEVELLO, ROSELIA
Efeito do extrato de mirtilo e do carbonato de lítio sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo experimental de mania. In: XXIV Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2015, Pelotas.
Anais do XXIV Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2015.
5. PUREZA, J.; DEBOM, G. N.; COUTO, C. A. T.; LENCINA, C.; GAZAL, M.; SPANEVELLO, ROSELIA
Tratamento com extrato de mirtilo previne alterações na atividade das enzimas NTPase e Adenosina deaminase em linfócitos de ratos submetidos a um modelo de mania. In: XXIV Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2015, Pelotas.
Anais do XXIV Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2015.
6. SOARES, FABIANO; DEBOM, G.; MOTTA, E.; MACHADO, C.; BRAGANHOL, E.; SPANEVELLO, ROSELIA
Avaliação da atividade de ectoenzimas em plaquetas de portadores de Síndrome de Down. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2014, Pelotas.
Anais de 2014, 2014.
7. MATTOS, BRUNA; DEBOM, G.; SILVA, T. M.; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, ROSELIA
Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em amostras de portadores de Síndrome de Down. In: 2014. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2014, Pelotas.
Anais de 2014, 2014.
8. DEBOM, G.; SOARES, M. S.; GONCALVES, F. G.; LENCINA, C.; GAZAL, M.; SPANEVELLO, R.
Efeito do extrato de mirtilo em parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em animais submetidos ao modelo experimental de mania. In: XVI ENPOS - Encontro da Pós-Graduação da UFPEL, 2014, Pelotas.
Anais de 2014, 2014.
9. SOARES, M.; DEBOM, G.; PUREZA, J.; GONCALVES, F. G.; STEFANELLO, F.; SPANEVELLO, R.
Efeito in vitro e in vivo da metionina e/ou metionina sulfóxido na atividade da adenosina deaminase em linfócitos de ratos. In: XVI ENPOS - Encontro da Pós-Graduação da UFPEL, 2014, Pelotas.
Anais de 2014, 2014.
10. MOTTA, E.; FERRERA, M.; DEBOM, G. N.; ORCY, R.; PERES, W.; SPANEVELLO, R.
Atividade de ectoenzimas em plaquetas de pacientes com síndrome cerebral submetidos ao exercício físico. In: XV Encontro de Pós-Graduação UFPEL, 2013, Pelotas.
Anais do XV Encontro de Pós-Graduação UFPEL, 2013.
11. SOARES, F.; RODRIGUES, R.; DEBOM, G. N.; MACHADO, C.; BRAGANHOL, E.; SPANEVELLO, R.
Avaliação dos parâmetros inflamatórios em linfócitos e soro de portadores de síndrome de Down. In: XXII Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2013, Pelotas.
Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2013.
12. PUREZA, J.; MACHADO, C.; SOARES, F.; DEBOM, G. N.; SILVA, T. M.; SPANEVELLO, R.
Efeito in vitro da metionina e metionina sulfóxido na atividade da enzima NTPase em linfócitos de ratos. In: XXI Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2013, Pelotas.
Anais do XXI Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2013.
13. DEBOM, G. N.; RITTER, M.; PEREIRA, C.; SPANEVELLO, R.
Efeito in vitro de chalconas sintéticas na atividade da enzima adenosina deaminase em soro de ratos. In: XXI Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2013, Pelotas.
Anais do XXI Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2013.
14. DEBOM, G. N.; SILVEIRA, E. F.; TEIXEIRA, F. C.; RITTER, M.; PEREIRA, C.; BRAGANHOL, E.; SPANEVELLO, R.
Efeito de chalconas sintéticas na atividade da enzima NTPase em linfócitos de ratos. In: 21º Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2012, Pelotas.
Anais do 21º Congresso de Iniciação Científica UFPEL, 2012.

Apresentação de trabalho e palestra

1. SOARES, M.; DEBOM, GABRIELA; OLIVEIRA, Patrícia; COUTO, C. A. T.; TAVARES, R.; STEFANELLO, FRANCIELI; SPANEVELLO, ROSELIA
ANÁLISE DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO EM PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM HIPÓCAMPO DE RATOS JOVENS, 2015. (Congresso/Apresentação de Trabalho)
2. DEBOM, GABRIELA; COUTO, C. A. T.; SOARES, M.; RODRIGUES, RODRIGO; SPANEVELLO, ROSELIA
Avaliação de níveis séricos de imunoglobulinas e da atividade da enzima adenosina deaminase em eritrócitos e linfócitos de portadores de síndrome de Down, 2015. (Congresso/Apresentação de Trabalho)
3. DEBOM, G. N.; COUTO, C. A. T.; SOARES, M.; RODRIGUES, R.; SPANEVELLO, R.
ANÁLISE DE NÍVEIS SÉRICOS DE IMUNOGLOBULINAS E DA ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE EM ERIÓCITOS E LINFÓCITOS DE PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN, 2015. (Congresso/Apresentação de Trabalho)
4. SOARES, M.; DEBOM, GABRIELA; OLIVEIRA, Patrícia; TAVARES, R.; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, R.
EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE RATOS JOVENS, 2015. (Congresso/Apresentação de Trabalho)
5. DE MATTOS, BRUNA DA SILVEIRA; DEBOM, G. N.; SOARES, M.; LENCINA, C.; GAZAL, M.; SPANEVELLO, ROSELIA
EFEITO DO EXTRATO DE MIRTILO E DO CARBONATO DE LÍTIO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREAL DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE MANIA, 2015. (Congresso/Apresentação de Trabalho)
6. SOARES, M.; DEBOM, G. N.; COUTO, C. A. T.; PUREZA, JESSICA; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, R.
EFFECT OF ACUTE AND CRONIC TREATMENT WITH METIONINE AND/OR METIONINE SULFOXIDE ON ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN LYMPHOCYTES FROM YOUNG RAATS, 2015. (Congresso/Apresentação de Trabalho)
7. DEBOM, G. N.; GAZAL, M.; SOARES, M.; DE MATTOS, BRUNA DA SILVEIRA; TAVARES, R.; STEFANELLO, F. M.; GHISLENI, G.; LENCINA, C.; SPANEVELLO, ROSELIA
EFFECTS OF BLUEBERRY EXTRACT IN OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN HIPPOCAMPUS OF RATS SUBMITTED TO AN EXPERIMENTAL MODEL OF MANIA, 2015. (Congresso/Apresentação de Trabalho)
8. PUREZA, J.; DEBOM, G. N.; COUTO, C. A. T.; LENCINA, C.; GAZAL, M.; SPANEVELLO, R.
TRATAMENTO COM EXTRATO DE MIRTILO PREVINE ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPASE E ADENOSINA DEAMINASE EM LINFÓCITOS DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE MANIA, 2015. (Congresso/Apresentação de Trabalho)
9. DEBOM, G. N.; RITTER, M.; PEREIRA, C.; SPANEVELLO, R.
Efeito in vitro de chalconas sintéticas na atividade da enzima adenosina deaminase em soro de ratos, 2013. (Congresso/Apresentação de Trabalho)

10/03/2024, 11:55

Currículo Lattes

10.  DEBOM, G. N.; SILVEIRA, E. F.; TEIXEIRA, F. C.; RITTER, M.; PEREIRA, C.; BRAGANHOL, E.; SPANVELLO, R.
Efeito das chalconas sintéticas na atividade da enzima NTPDase em linfócitos de ratos, 2012.
(Congresso Apresentação de Trabalho)
11.  DEBOM, G. N.; BRAGANHOL, E.; GAMARO, G. D.; PEREIRA, C.; SILVEIRA, E. F.; TEIXEIRA, F. C.; SILVA, K. S.; SCHMATZ, R.; SPANVELLO, R.
Efeito in vitro das chalconas na atividade da NTPDase de linfócitos de ratos, 2012.
(Congresso Apresentação de Trabalho)
12. DEBOM, G. N.; NUNES, E.; PLACA, J. R.; GOEDERT, L.; GABOARDI, G.; PEREIRA, J. L.; KJARKE, G. B.; GONCALVES, C. X.; BRUM, C. B.; VASCONCELOS, F. A.; PINTO, V. S.; DODE, L. B.
MURAL 0-BKOTEG, 2010. (Congresso Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Redes sociais, websites, blogs

1. DEBOM, G.; RUBENICH, D. S.
Ciência Traduída, 2020

Educação e Popularização de C&T

Redes sociais, websites e blogs

1. DEBOM, G.; RUBENICH, D. S.
Ciência Traduída, 2020. (Redes Sociais, Mídias sociais, websites, blogs)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 10/03/2024 às 11:55:37.