

**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**

UFCSPA
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 (LabBraganhol). 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-1 α - Interleucina 1 α

IL-1 β – Interleucina 1 β

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- κ B - 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*

S100 β - 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/micróglias 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.

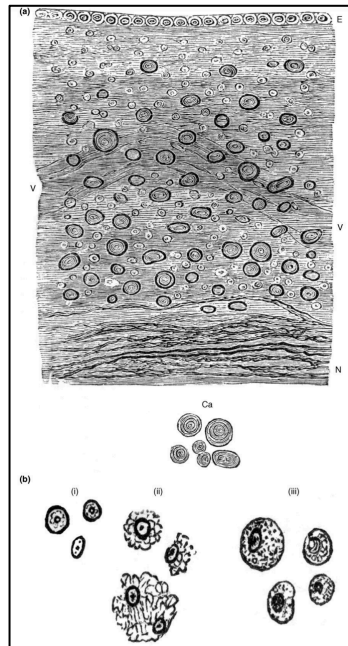


Figura 1: Ilustração da neuroglia conforme descrita por Rudolf Virchow. (a) Para Virchow, a neuroglia consistiria em uma porção independente de tecido conjuntivo repleto de “fibras gliais” que permearia alguns “componentes celulares, destacados em (b). (i) Núcleos livres com nucléolo, (ii) núcleos com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

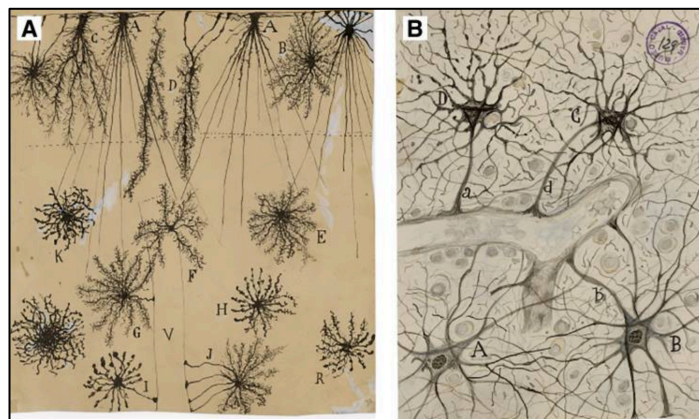


Figura 2: Imagens da astroglia desenhadas por Santiago Ramon y Cajal. Em (A) é possível visualizar uma imagem feita a partir da técnica de Golgi, e em (B) desenhos de astrócitos perivascularres. Fonte: Imagens retiradas de (5)

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).

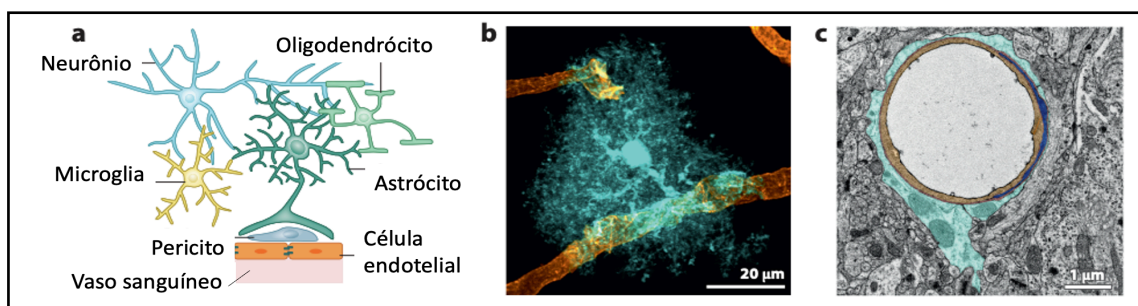


Figura 3: Morfologia dos pés terminais de astrócitos. (a) Esquema representando as interações conhecidas dos astrócitos com outros tipos de células do SNC. (b) Imagem de microscopia confocal de um astrócito (azul-petróleo) interagindo com capilares cerebrais (laranja). Os “pés” dos astrócitos podem ser 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).

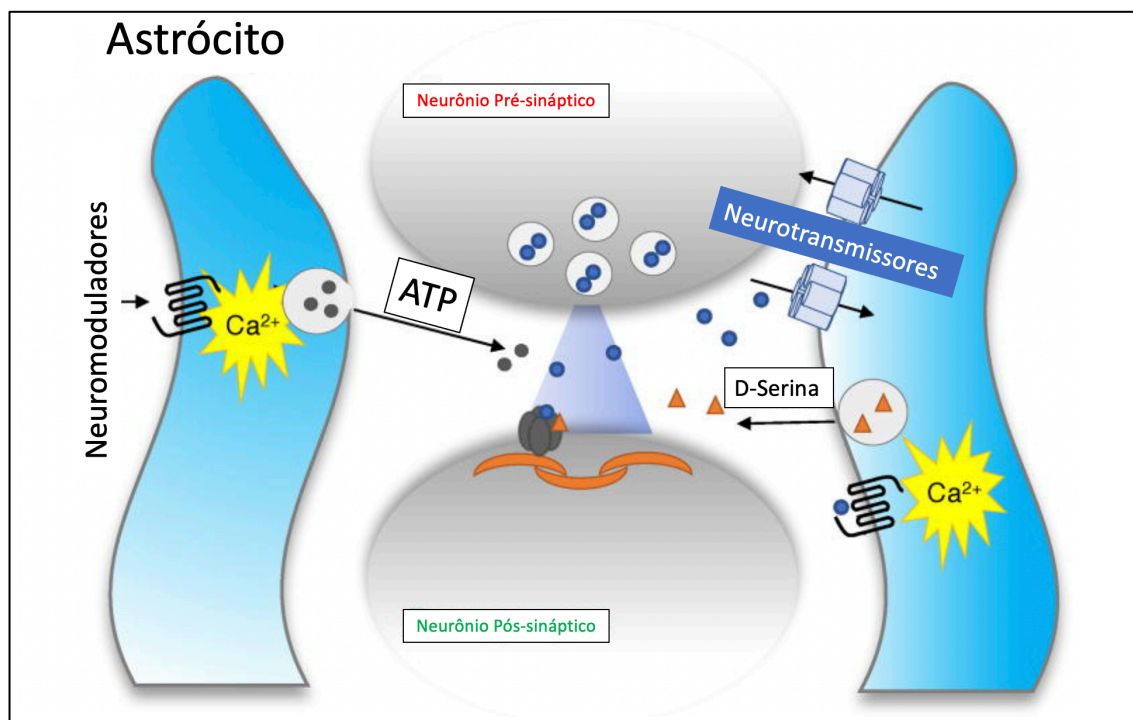


Figura 4: Participação ativa dos astrócitos da sinapse tripartite. Os astrócitos possuem a capacidade de detectar a atividade sináptica e responder a ela através de ondas intracelulares de Ca^{2+} , levando à liberação de gliotransmissores que podem sinalizar de volta às sinapses. Fonte: figura adaptada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

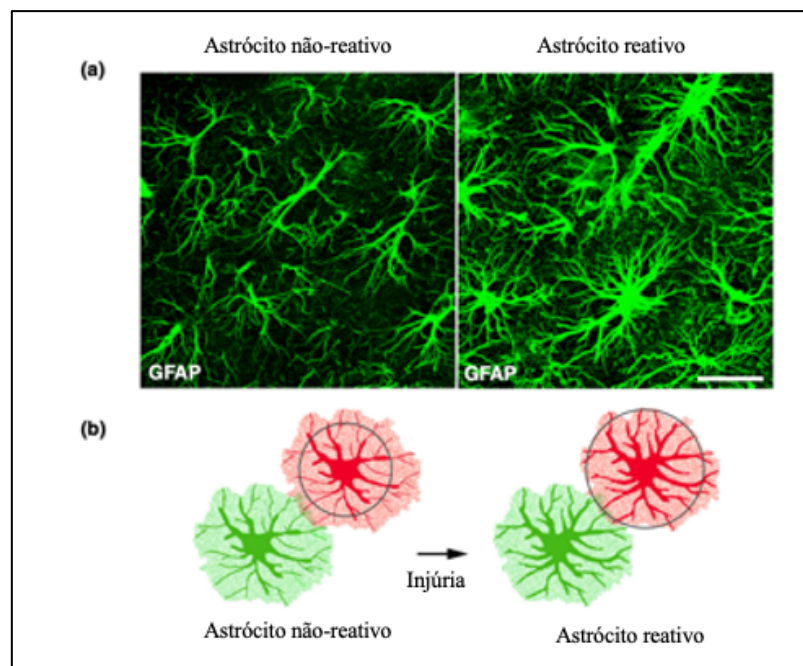


Figura 5: Os astrócitos reativos apresentam aumento da expressão da proteína GFAP e hipertrofia. (a) Os filamentos intermediários foram marcados utilizando anticorpos contra GFAP (e podem ser visualizados na cor verde) e revelam hipertrofia dos processos celulares dos astrócitos reativos (direita) em 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).

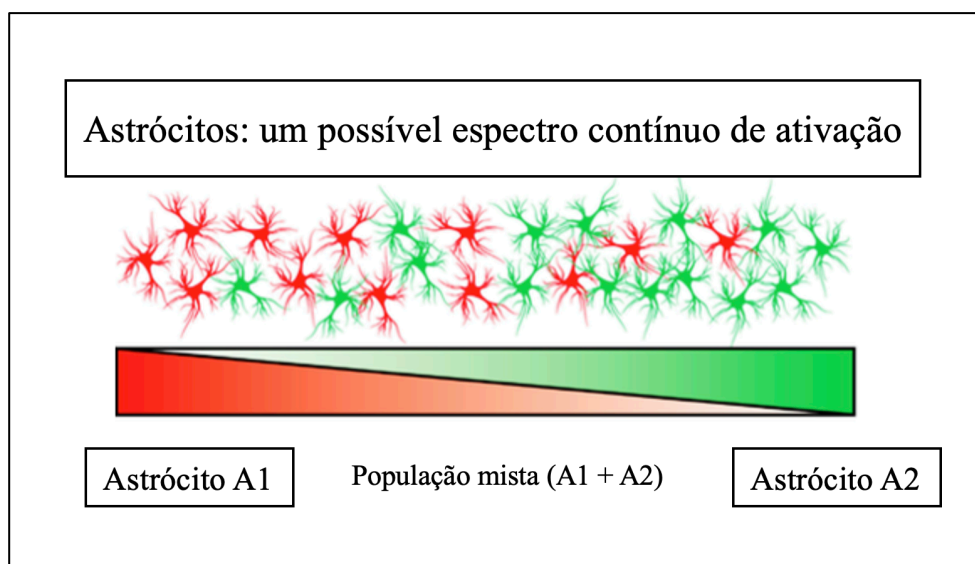


Figura 6: Possível delineamento do perfil dos astrócitos reativos. Fonte: adaptado de (24).

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).

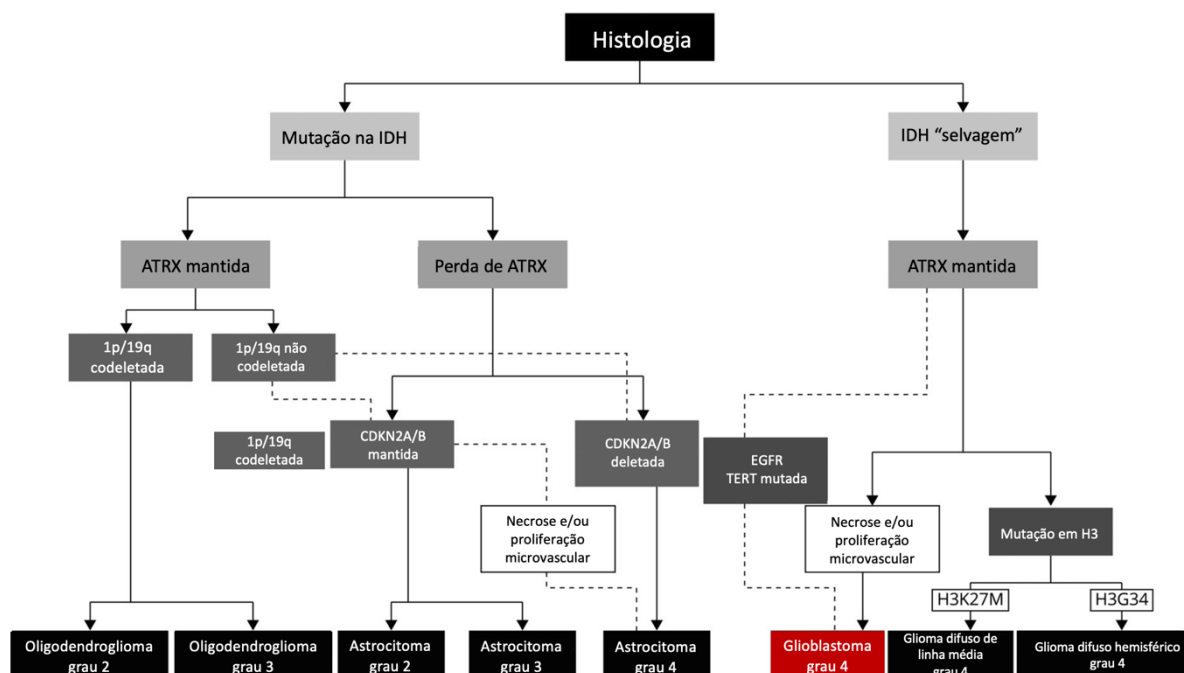


Figura 7: Fluxograma da classificação e estadiamento de gliomas de acordo com a atualização da WHO realizada no ano de 2021. O novo processo de estadiamento do tumor leva em consideração a análise da morfologia das células, a partir de um ensaio anatomopatológico, e do uso de marcadores moleculares, 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 permear 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, conseqüentemente, 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). Conseqüentemente, 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.

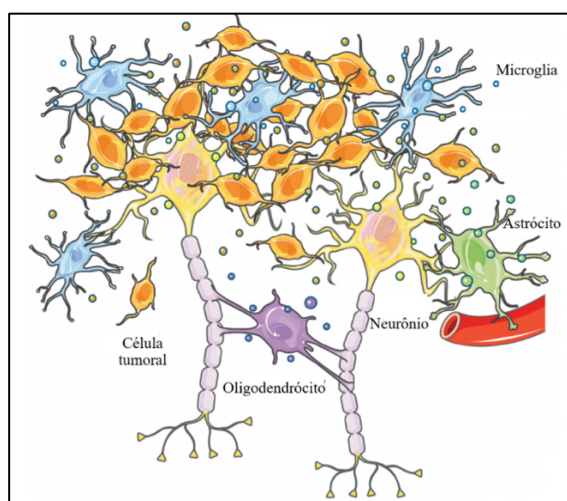


Figura 8: O microambiente tumoral do GB. As células tumorais interagem com diferentes tipos celulares, como astrócitos, neurônios, oligodendrócitos e microglia. Fonte: Ilustração adaptada de (52).

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).

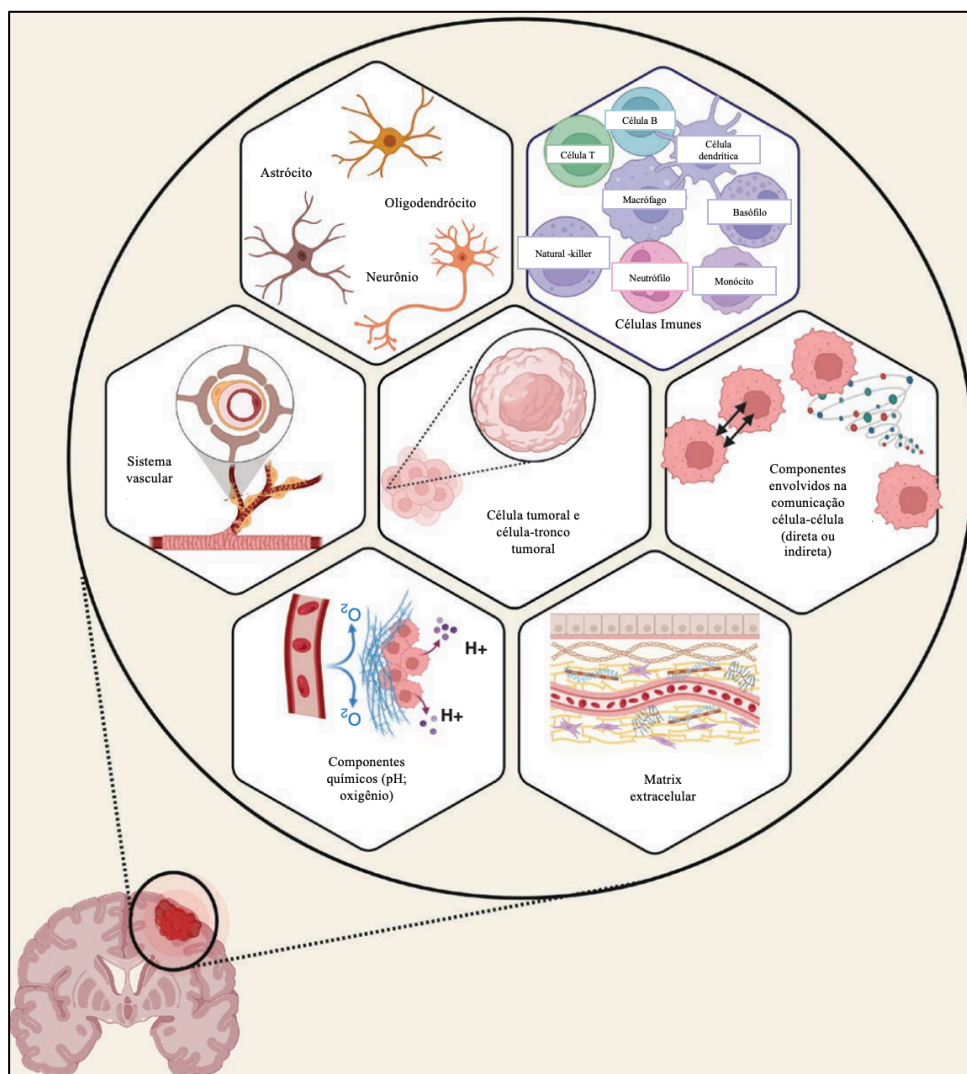


Figura 9: Representação esquemática dos componentes do TME nos gliomas/glioblastoma. O TME destes tumores é um sistema complexo, heterogêneo e interativo composto não só de células tumorais, mas também de células-tronco tumorais, células imunes, nervosas e do sistema vascular, além da matriz extracelular. 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.

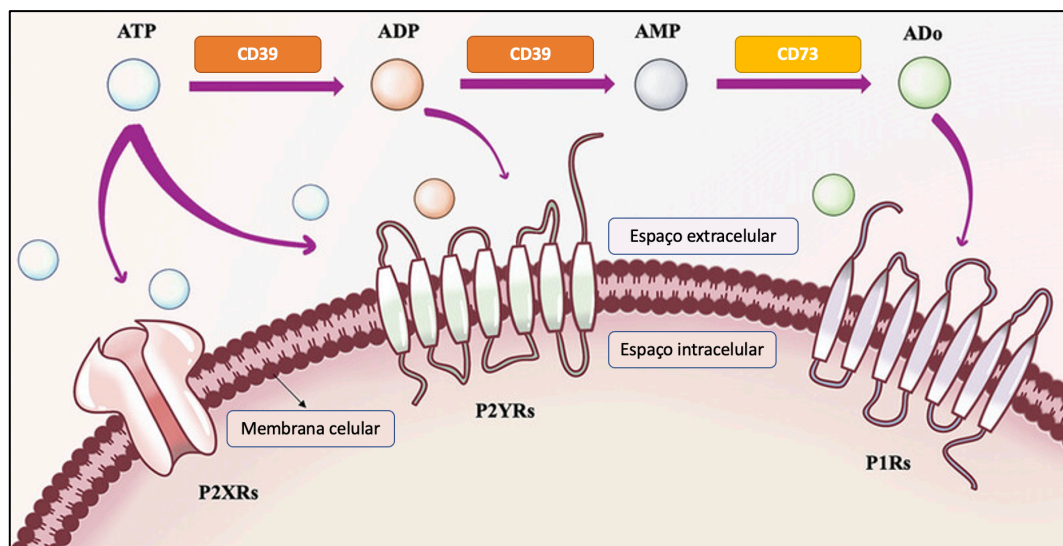


Figura 10: Representação gráfica da cascata purinérgica contendo enzimas de hidrólise de nucleotídeos/nucleosídeo e os receptores específicos. Fonte: imagem adaptada de (66).

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, conseqüentemente, 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 efetoras 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

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 (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

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

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)
Sarmento Leite, 245 – Main Building – Room 304
Zip code: 90.050-170, Porto Alegre, RS, Brazil
Phone: +55 51 3303 8762

Manuscrito em preparação

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 efetoras 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 imunossupressor, 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 genéticas 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 possui 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 radioresistência - 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, Pudevalli 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. Braganhol 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, Braganhol 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 JJJ, 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, Esmaeili 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, Olivada 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, Liddelow 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. Lavrnja I, Laketa D, Savic D, Bozic I, Bjelobaba I, Pekovic 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, Mülle 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, Battastini 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. Schaeue 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, Oujii 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, Kasthuber 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

SGI-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

handle animals.

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

31/10/2022 12:55

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

Name	E-Mail	Employer
Marcus Malek	MALEKMM@upmc.edu	U of Pgh School of Medicine Surgery
Marco Marzulli	MAM341@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Molecular Genetics and Biochemistry
Brooke Myers	BRM186@pitt.edu	Other
Jessie Nedrow	JRN189@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Radiology
Ambika Parmar	APP52@pitt.edu	Cancer Centers
Itay Raphael	RAI18@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Immunology
Lauren Rosenblum	rosenblumlt@upmc.edu	Other
ReidAnn Sever	RES197@pitt.edu	Other
Chaim Sneiderman	CTS36@pitt.edu	U of Pgh Associate Vice Chancellor of Human Resources All Temps

Name	E-Mail	Employer
Sarah Vincze	SRV32@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Neurological Surgery
Yijen Wu	YIJENWU@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine

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

Name	E-Mail	Employer
Jagmohan Hooda	JAH338@pitt.edu	UPCI Basic Research Administration
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
Marcus Malek	MALEKMM@upmc.edu	U of Pgh School of Medicine Surgery
Marco Marzulli	MAM341@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Molecular Genetics and Biochemistry
Jessie Nedrow	JRN189@pitt.edu	U of Pgh School of Medicine Radiology
Ambika Parmar	APP52@pitt.edu	Cancer Centers

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**

the persons listed above as observers:

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.

11.0 If any aspect of this protocol will involve individuals who are not listed above, you must describe in detail what training will be provided prior to any animal experimentation. Your description must include the topics to be covered, who will perform the training, the expected length of time for the training session, a description of the individuals attending and how you will document the training.

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

12.0 * Does the funding source/sponsor of this study require compliance with GLP (Good Laboratory Practice) Standards?
 Yes No

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](#).

13.0 * PI Contact Information (Mailing Address, Phone Number):
Gary Kohanbash
Department of Neurological Surgery
UPMC Presbyterian, Suite B-400
200 Lothrop Street
Pittsburgh, PA 15213

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 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

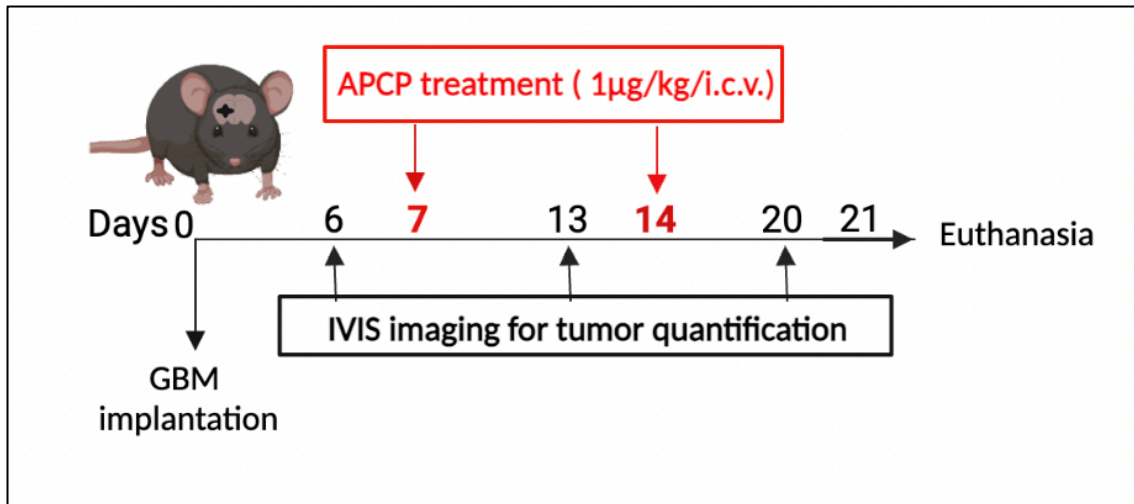


Figure 1: Experimental timeline.

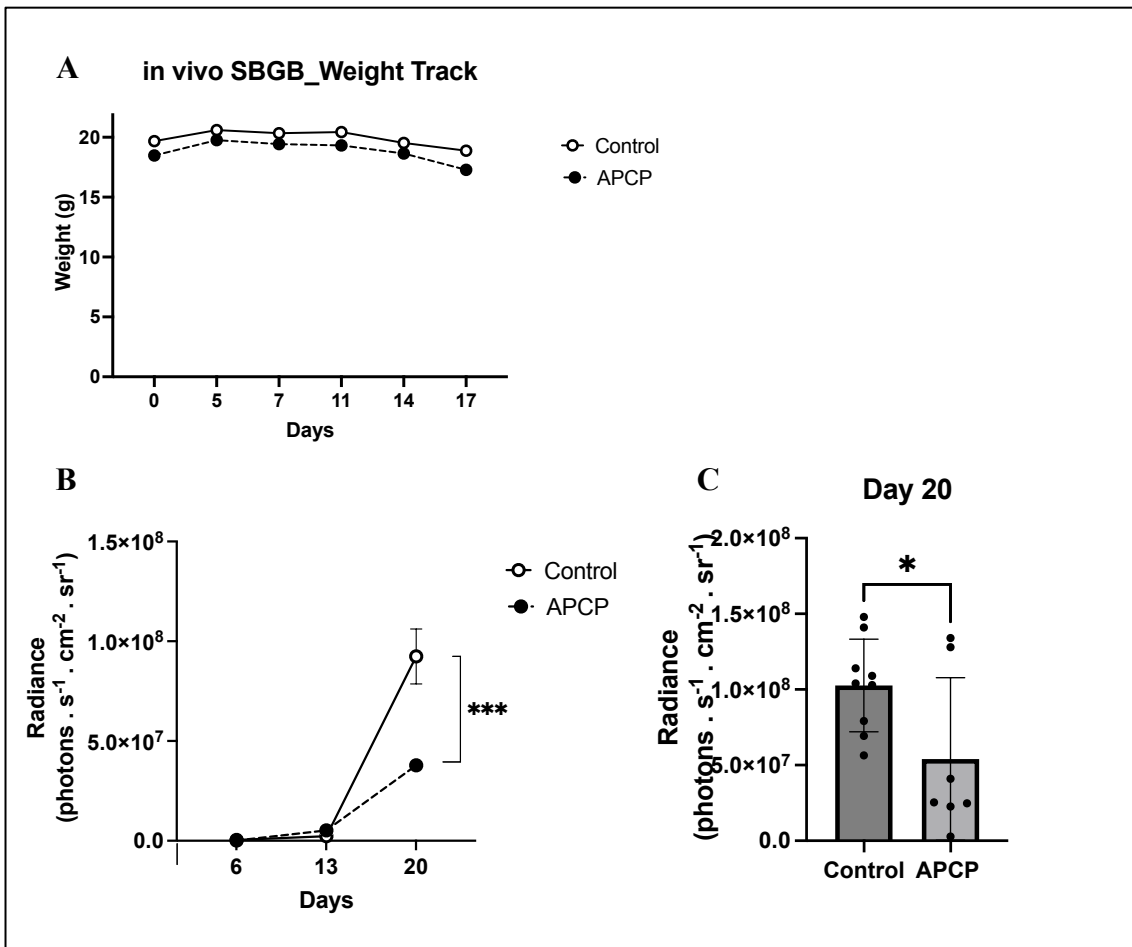


Figure 2: (A) Weight track of animals from negative control and treated with APCP. (B) Luminescence intensity of tumors across the days and (C) on day 20. Data are presented as mean \pm SEM, $*p < 0.05$; $***p < 0.001$, in (B) two-way analysis of variance (ANOVA) with Sidak's multiple comparison test, 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. Astrogliose 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	Peptotech (PeptoTech, 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.

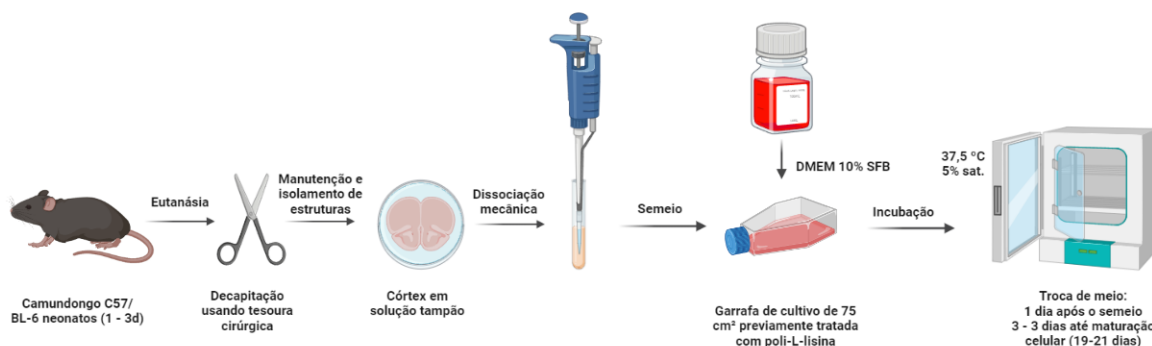
4.2.2. Metodologia aplicada para atender o **Objetivo específico 1**: Padronizar o protocolo de realização de culturas primárias de astrócitos corticais a partir de camundongos neonatos da linhagem C57/BL-6.

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**).

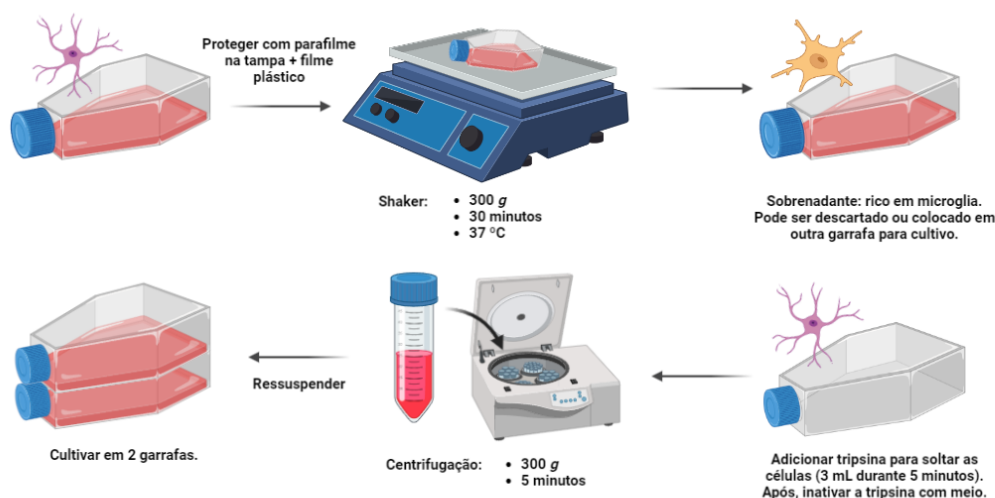
Preparo das garrafas com poli-L-lisina: primeiramente a poli-L-lisina (**Tabela 1**) foi aliqüotada no volume de 1 mL em eppendorf de 1,5 mL e mantida sob refrigeração a -20 °C. Para cada garrafa de 75 cm², foi utilizada uma aliqüota de poli-L-lisina diluída na proporção 1:1000 em água milli-Q. A garrafa 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.

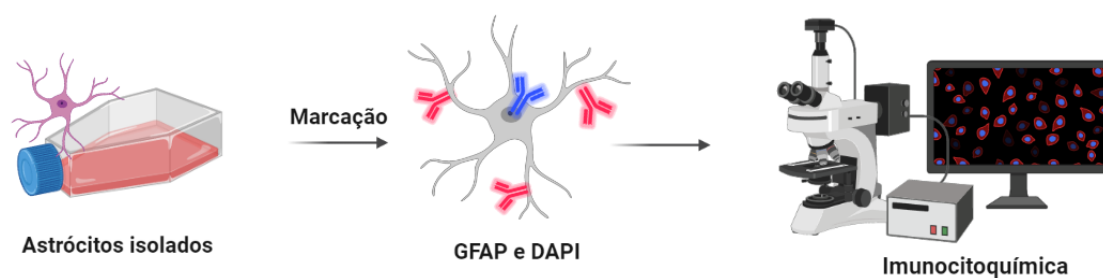


Fonte: Autoria própria, 2022 - adaptado de Bio Render.

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.



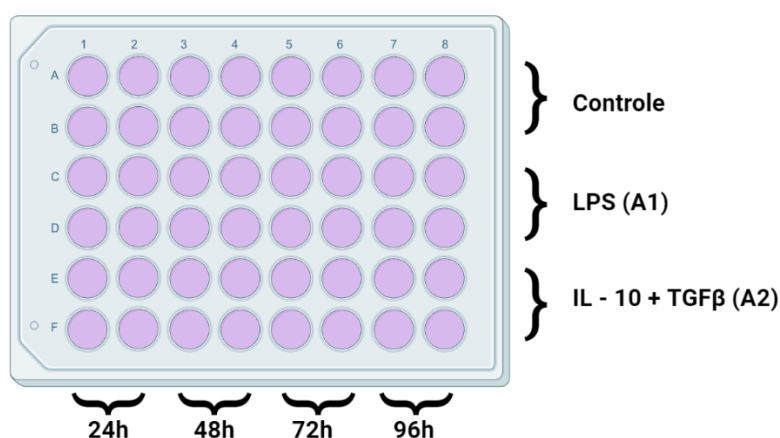
Fonte: Autoria própria, 2022 - adaptado de Bio Render

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/coverlip) 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.



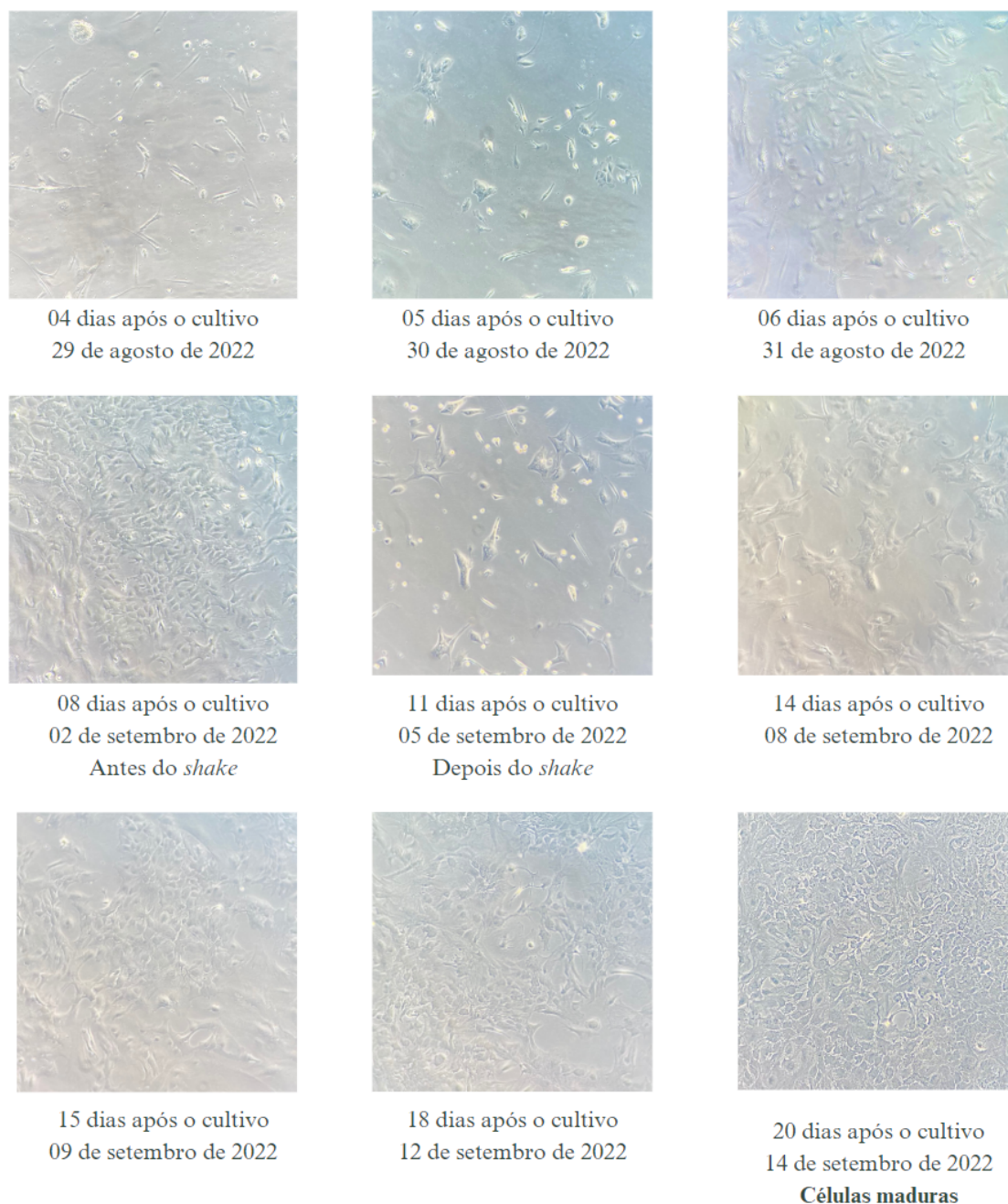
Fonte: Autoria própria, 2023 - adaptado de Bio Render

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. Magnificância: 20x.



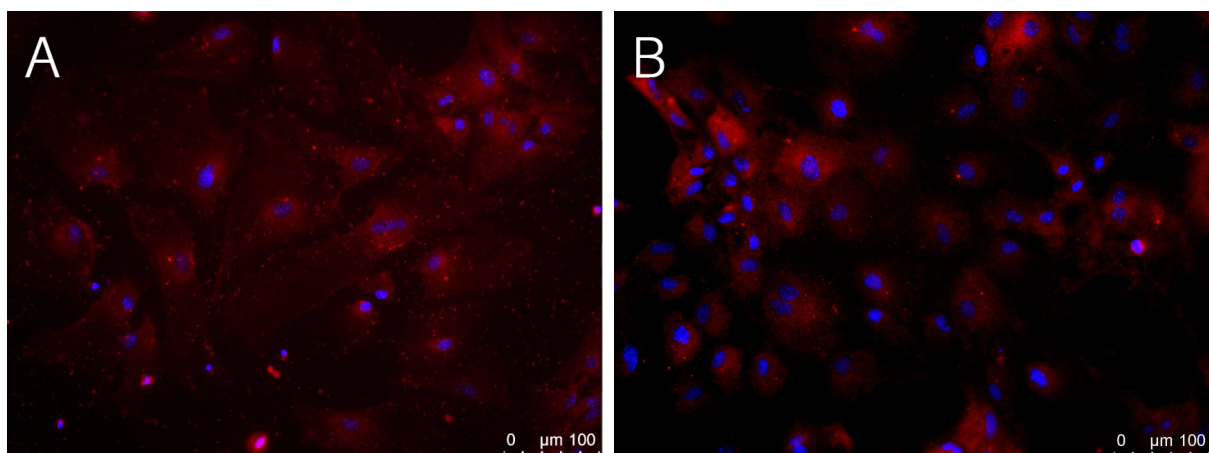
5.2. Análise qualitativa do grau de pureza das culturas de astrócitos produzidas utilizando a proteína GFAP como marcador.

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.

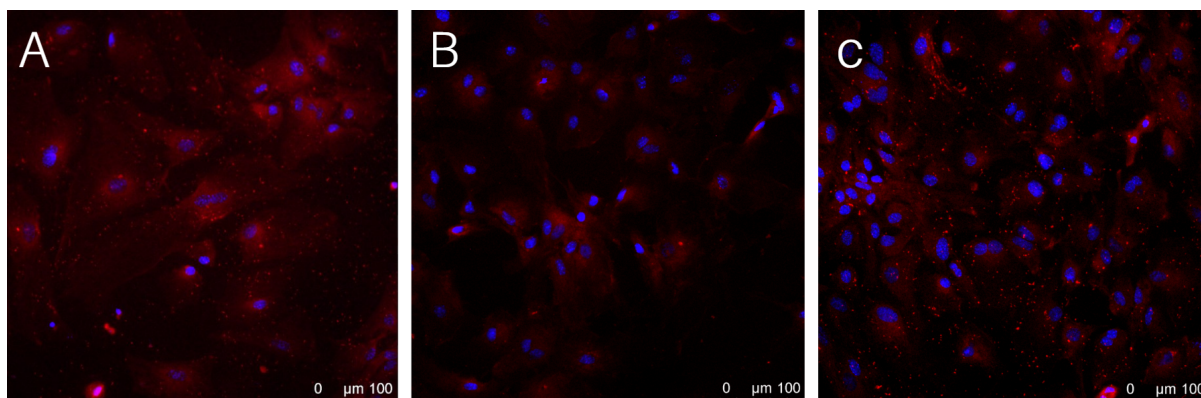


5.3 Avaliação da viabilidade celular das culturas primárias de astrócitos frente a indução dos fenótipos A1 e A2, utilizando o tratamento com LPS e a combinação de TGF β e IL-10, respectivamente.

A partir da padronização da cultura de astrócitos, realizamos experimentos para determinar o impacto de indutores de polarização A1 e A2, LPS e TGF β + 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 TGF β + 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.

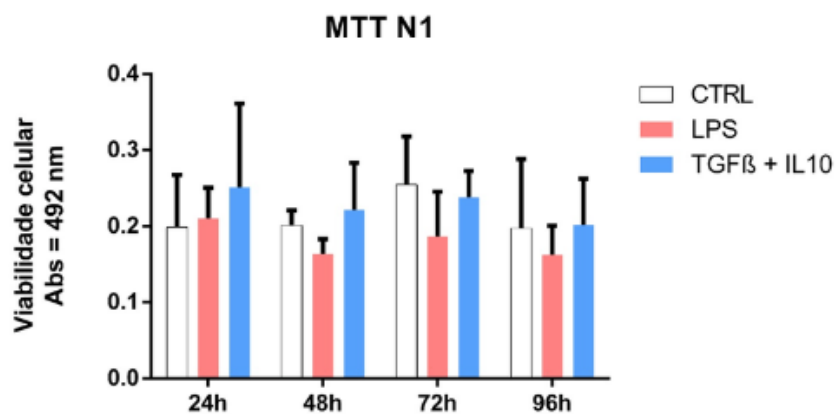
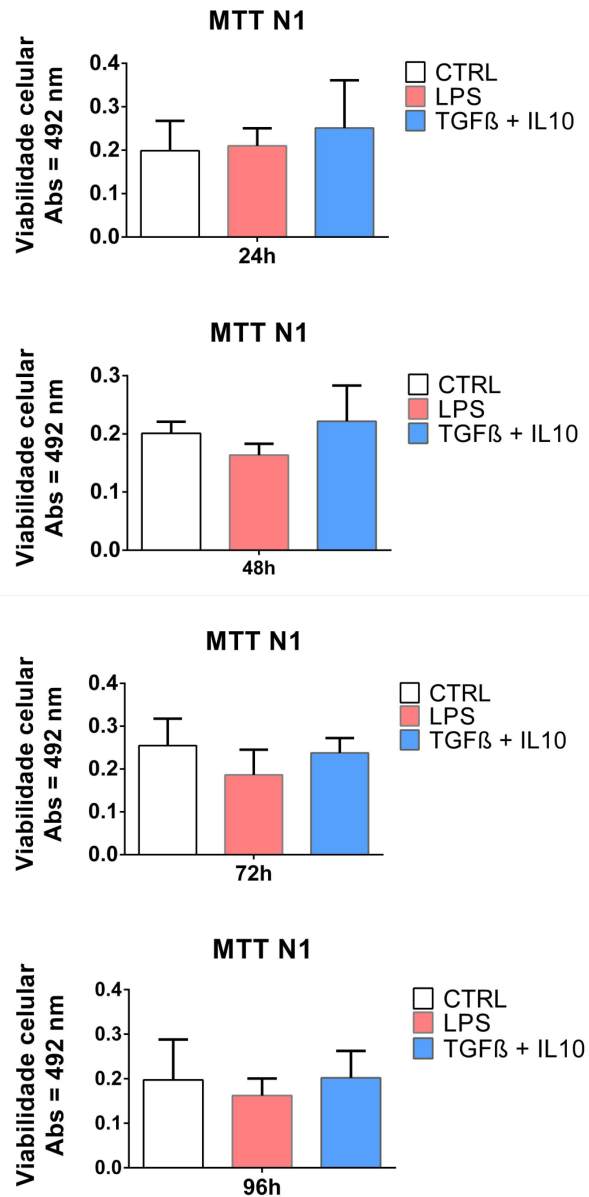


Figura 13. Análise da viabilidade celular de astrócitos primários após o tratamento com LPS (10 ng/mL), TGF β (1 ng/mL) em combinação com IL-10 (10 ng/mL). A análise de MTT foi realizada nos tempos indicados. Experimento realizado em quadruplicata de um cultivo primário. Os resultados foram expressos 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 Sarmiento 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	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Introdução	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Comentários
Objetivos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Relevância e Justificativa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Materiais e Métodos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Cronograma para execução da pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> 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: **Número Amostral:**

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

UFCSA

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:

Local de Realização (Biotério/Labotatório):

Biotério da UFCSA.

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 Debon**Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/1992007701339280>

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 enzimiologia, cultivo celular, patologias envolvendo o sistema inflamatório e câncer. Atualmente realiza doutorado em BioCiências na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), 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 sandoche na University of Pittsburgh, financiado pelo programa PDSE/Capes.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Gabriela Nogueira Debon

Dados pessoais

Filiação Aroldo Debon e Maria Laura Nogueira Debon

Nascimento 02/03/1993 - Pelotas/RS - Brasil

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

CPF 022.036.530-00

Endereço residencial Avenida Lageado, 721 - apartamento 202
Pelotas - Porto Alegre
90492-110, RS - Brasil
Telefone: 53 996076480
Celular 53 996076480Endereço eletrônico E-mail para contato : gabriela.debon@gmail.com
E-mail alternativo gabrieldebon@gmail.com**Formação acadêmica/titulação**

- 2019** Doutorado em **BIOCIÊNCIAS**.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil
com período sandoche em University of Pittsburgh (Orientador: Prof. Dr. Gary Kharbush)
Título: Análise da participação da sinalização purinérgica na polarização pró- ou anti-inflamatória de astrócitos associados ao tumor
Orientador: Profa Dra Elizandra Bragantini
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 extrato de melão em parâmetros comportamentais, bioquímicos e de estresse oxidativo em animais submetidos a um modelo experimental de mania. Ano de obtenção: 2016
Orientador: Rosella Maria Spanevello
Co-orientador: Marta Gazzi
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 estrênicos e infelizes do período de Síndrome de Down
Orientador: Rosella Maria Spanevello

Formação complementar

- 2015 - 2015** Curso de curta duração em **Mínicurso 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 Práct. da Experimentação Animal**. (Carga horária: 6h).
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
- 2010 - 2010** Extensão universitária em **Mural C-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** Biotag. em **Unid. Hemotóp. e Lab. de Saúde Póst. .** (Carga horária: 30h).
TELELAB, TELELAB, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pelotas - UFPPEL

Vínculo Institucional

2014 - 2016 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestrando - CAPES, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações: Atuando no Laboratório de Neuroquímica, Infamação 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, Infamação 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 - UFCS/PA

Vínculo Institucional

2021 - 2021 Vínculo: Voluntário, Enquadramento funcional: Ações 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: - Atuação 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: Dedicção exclusiva

Projetos

Projetos de pesquisa

2019 - Atual Microambiente tumoral: Avaliação da participação dos astrócitos na progressão dos gliomas.

Descrição: A atividade astrócítica é a resposta universal dos astrócitos frente à injúria cerebral e patologias diversas, como trauma, infecção, neurodegeneração e isquemia. 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 desafiadora de tumor cerebral primário, tendo seu prognóstico extremamente desanimador devido a realidade 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 malignidade 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: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Doutorado (1);

Instituições: Gabriela Nogueira Debon; Elizandra Braganhol (Responsável)

2012 - 2014 ANÁLISE DO SISTEMA PURINÉRGICO EM ANIMAIS EXPOSTOS AO ESTRESSE CRÔNICO VARIANDO ALTERAÇÕES BIQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS

Descrição: Objetivo Geral: Avaliar as atividades E-NTPDásicas e de ecto-5'-nucleotidase em astroglia/córtex de ratos submetidos ao estresse crônico variável. Além disso, avaliaremos respostas nociceptiva, inflamatória, antioxidante 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-NTPDásicas e de ecto-5'-nucleotidase em astroglia/córtex de ratos; b) Determinar os níveis de enzimas antioxidantes e estresse oxidativo (mediado através da determinação da concentração de malondialdeído, catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase) do SNC no córtex; c) Avaliar a resposta nociceptiva em animais submetidos ao estresse crônico variável; d) Avaliar o comportamento dos animais na bateria de Campo Aberto.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (3);

Instituições: Gabriela Nogueira Debon; Giovana Duzzo Gemaro (Responsável); Elizandra Braganhol; Rosália Spanevello; Adriana Loureiro da Silva; Inaci Luciana da Silva Torres; Alina Longo; Karen de Souza da Silva

2012 - 2014 Estado do perfil oxidativo e avaliação enzimática em linfócitos e plaquetas de portadores com síndrome de Down.

Descrição: Verificar as alterações na atividade das enzimas NTPDase e adenosina desidrase em linfócitos de pacientes portadores da Síndrome de Down e indivíduos saudáveis. - Determinar a atividade das enzimas NTPDase, 5'- nucleotidase e adenosina desidrase em plaquetas de pacientes portadores da Síndrome de Down e indivíduos saudáveis. - Avaliar o perfil de agregação plaquetária de portadores de síndrome de Down. - Analisar a expressão da enzima NTPDase em plaquetas e linfócitos de portadores de síndrome de Down e indivíduos controles. - Determinar a concentração de nucleotídeos e nucleotídeo de adenosina no soro de pacientes portadores da Síndrome de Down e indivíduos saudáveis. - Avaliar o estado das defesas antioxidantes não enzimáticas através da determinação dos níveis de soro não proteicos, vitamina C e vitamina E no soro destes pacientes. - Verificar o estado das defesas antioxidantes enzimáticas através da determinação da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx) em sangue de portadores 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 proteica em soro de pacientes portadores da Síndrome de Down e do grupo controle.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (4); Mestrado acadêmico (2);

Instituições: Gabriela Nogueira Debon; Giovana Duzzo Gemaro; Elizandra Braganhol; Rosália Spanevello (Responsável); Karen de Souza da Silva; William Pires; Giberio Garcia; Maria Rosa Chitolina Schelinger; Carla Dalmas; Rodrigo Rodrigues; Elita Ferreira da Silveira; Joana Maria de Costa; Augusto Nator Goluzo

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'-NTPDase, ANPC (α,β-metileno-ADP), e de formulações em lipossomas contendo seqüências de RNA de interferência para ecto-5'-NTPDase sobre a proliferação in vitro dos gliomas.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (2);

Instituições: Gabriela Nogueira Debon; Elizandra Braganhol; Rosália Spanevello (Responsável); Karen de Souza da Silva; Maria Rosa Chitolina Schelinger; Rodrigo Rodrigues; Elita Ferreira da Silveira; Ana M. O. Batistoni

2011 - 2014 Avaliação de chalconas sintéticas como agentes antitumorais e imunomoduladores

	<p>Descrição: O objetivo do presente projeto é avaliar, através de estudos in vitro, o 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/colitase e da apoptose em linfócitos de ratos. Meta: 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 NTPDase e adenosina deaminase 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/colitase e AChE em linfócitos de ratos.</p> <p>Situação: Em andamento Natureza: Projeto de pesquisa Alunos envolvidos: Graduação (1); Integrantes: Gabriela Nogueira Debom; Rosália Spanevello; Aethio Gatto Bartschak (Responsável); Francieli Moro Stefanelli; Tiago Collares</p>
2011 - 2013	<p>ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA PROGRESSÃO DOS GLIOMAS</p> <p>Descrição: Objetivo Geral: Investigar o envolvimento das E-NTPDases 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 Debom; Elizandra Braganhol (Responsável); Rosália Spanevello; Karen de Souza da Silva; Rodrigo Rodrigues; Elita Ferreira da Silveira; Fatima Terezinha Beira; Francisco Del Pino; Ana M. O. Battastini</p>
Projeto de extensão	
2012 - 2012	<p>Mural G-Bioteo em ação</p> <p>Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Gabriela Nogueira Debom; Luciana Bocca Dade (Responsável)</p>
2012 - 2012	<p>Mural G-Bioteo</p> <p>Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Gabriela Nogueira Debom; Luciana Bocca Dade (Responsável)</p>
2012 - 2012	<p>Mural CIEP-Biotec: Biotecnologia invade a escola</p> <p>Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Gabriela Nogueira Debom; Luciana Bocca Dade (Responsável)</p>
2010 - 2010	<p>Mural G-Bioteo</p> <p>Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Gabriela Nogueira Debom; Luciana Bocca Dade (Responsável)</p>

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, PRISCILA OLIVEIRA TEIXEIRA, FERNANDA CARDOSO, DEBOM, GABRIELA NOGUEIRA, LENZ, GABRIELA SPIES, ROLAND, GABRIELA GONCALVES, DE CÁSSIA SANTANA, RITA, VISIOLI FERNANDA, FACHEL, FLÁVIA NATHIELY SILVEIRA, MICHELS, LUANA ROBERTA, AZAMBUJA, JULIANA HOPFSTÄTTER, TEIXEIRA, HELDER FERREIRA; [BRAGANHOL, ELIZANDRA](#)
Metastatic Melanoma: A Preclinical Model Standardization and Development of a Chitosan-Coated Nanoemulsion Containing Temociclovir to Treat Brain Metastasis. CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY. [DOI](#), v.43, p.2939 - 2951, 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.848476 - , 2022.
3. [DOI](#) SOARES, MAYARA SANDRELLY PEREIRA; ZANUSSI COSTA, MARCELO; DA SILVA, TATIANE MORGANA; GAZAL, MARTA; COUTO, CARLUS AUGUSTU TAVARES DO; [NOGUEIRA DEBOM, GABRIELA](#); RODRIGUES, RODRIGO; HOPFSTÄTTER AZAMBUJA, JULIANA; ANDRE CASALI EMISSION, MORITZ; CESAR EDUARDO JACINTINO, PRISCILA DUARTE; MARTA; [BRAGANHOL, ELIZANDRA](#); MORO STEFANELLO, FRANCIELI; MARIA SPANEVELLO, ROSELIA
Methionine and/or Methionine Sulfoxide Alter Ectoenzymes Activities in Lymphocytes and Inflammatory Parameters in *Rattus* from Young Rats: Acute and Chronic Effects. CELL BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS. [DOI](#), v.76, p.243 - 253, 2018.
4. [DOI](#) SOARES, MAYARA SANDRELLY PEREIRA; OLIVEIRA, PATRÍSCA SCUTO; [DEBOM, GABRIELA NOGUEIRA](#); DA SILVEIRA MATTOS, BRUNA; POLACHINI, CARLA ROBERTA; BALDISARELLI, LUCIANA; MORSCH, VERA MARIA; SCHETINGER, MARIA ROSA CHOTOLINA; TAVARES, REJANE GIACOMELLI; [STEFANELLO, FRANCIELI MORO](#); SPANEVELLO, ROSELIA MARIA
Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALAD activity in liver and kidney of young rats. AMINO ACIDS (WILEY-INTERSCIENCE). [DOI](#), v.49, p.129 - 138, 2017.
5. [DOI](#) GÖEDERT, LUCAS; PLAÇA, JESSICA; NUNES, EMILY; [DEBOM, GABRIELA](#); ESPREAFICO, BRUNO
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 SANDRELLY PEREIRA; DO COUTO, CARLUS AUGUSTU TAVARES; MATTOS, BRUNA; LENZINA, CLAYTON; KASTER, MANUELLA PINTO; GHISLENI, GABRIELE CODENONZI; TAVARES, REJANE; BRAGANHOL, E. CHAVES, VITOR CLASEN; REGINATTO, FLAVIO HENRIQUE; [STEFANELLO, FRANCIELI](#); SPANEVELLO, ROSELIA MARIA
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.293 - 299, 2016.
7. [DOI](#) FERREIRA, MAURÍCIO; RODRIGUES, RODRIGO; MOTTA, ELISE; [DEBOM, GABRIELA](#); SOARES, FABIANO; DE MATTOS, BRUNA DA SILVEIRA; MACHADO, CAROLINE; [STEFANELLO,](#)



FRANCIELLI MORA; DA SILVA, TATIANE MORGANA; MARTINS, CAROLINE CURRY; DALENOGARE, DIESSICA; MORSCH, VERA MARIA; BRAGANHOL, ELIZANDRA; SPANEVELLO, ROSELIA MARIA. Evaluation of extracellular adenosine nucleotides hydrolysis in platelets and biomarkers of oxidative stress in Down syndrome individuals. *Bioestímulo & Pharmacotherapy*, **4**(2-3), v.74, p.200 - 205, 2015.

8.  RODRIGUES, RODRIGO; DEBOM, GABRIELA; SOARES, FABIANO MACHADO; CAROLINE; PUREZA, JÉSSICA; PERES, WILLIAM; DE LIMA GARCIA, GILBERTO; DUARTE, MARTA FRESCURA; SCHEITNGER, MARIA ROSA CHITOLINA; STEFANELLO, FRANCIELLI; BRAGANHOL, ELIZANDRA; SPANEVELLO, ROSELIA. Alterations of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in lymphocytes of Down syndrome subjects: Relation with inflammatory parameters. *Clinica Chimica Acta (Paris)*, **4**(3-3), v.433, p.165 - 170, 2014.
9.  SILVEIRA, ELITA F.; CHASSOT, JANAINÉ M.; TEIXEIRA, FERNANDA C.; AZAMBUJA, JULIANA H.; DEBOM, GABRIELA; BEIRA, FÁTIMA T.; PINO, FRANCISCO A. B.; LOURENÇO, ADRIANA; HORN, ANA P.; CRUZ, LETÍCIA; SPANEVELLO, ROSELIA M.; BRAGANHOL, ELIZANDRA. Kelatoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. *Investigational New Drugs*, **4**(2-3), 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 Forense In: *Biocologia Forense 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, ROSELIA. Avaliação da administração crônica de metionina ou metionina sulfóxido em parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo de ratos jovens In: 14th Mostra de Pós-Graduação (Salão Universitário UCPel), 2015, Pelotas. *Anais da 14th Mostra de Pós-Graduação*, 2015.
2. SOARES, M.; DEBOM, G. N.; COUTO, C. A. T.; PUREZA, JÉSSICA; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, ROSELIA. 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 MATTOS, BRUNA DA SILVEIRA; TAVARES, R.; STEFANELLO, F. M.; GHISLENI, G.; LENCINA, C.; SPANEVELLO, ROSELIA. 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, Roselia Maria; BRAGANHOL, E. Direct signaling between astrocytes and glioma 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, LETÍCIA; SPANEVELLO, Roselia Maria; BRAGANHOL, E. Kelatoprofen 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 metionine and/or metionine sulfóxido modulates the NTPDase activity from rat lymphocyte In: 4th Brazilian Purine Club Meeting, 2013, Canelão. *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 coculturas 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 Purine analogue on ectonucleotidase activity in platelets from ischemic patients hospitalized on intensive unit therapy In: 4th Brazilian Purine Club Meeting, 2013, Canelão. *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, LETÍCIA; SPANEVELLO, ROSELIA; BRAGANHOL, E. Kelatoprofen 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, Canelão. *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. Metionine and Metionine sulfóxido treatment induces M1 macrophage polarization and modulates ectonucleotidase activities In: 4th Brazilian Purine Club Meeting, 2013, Canelão, 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, Canelão. *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. Celatoprofen em formulação de nanocapsulas reduz a viabilidade de gliomas 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.; SCHMATTZ, 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.; KLARKE, G. B.; GONCALVES, C. X.; BRUM, C. B.; VASCONCELOS, F. A.; PINTO, V. B.; DODE, L. B. MURAL, G-BIOTEC In: 19th Congresso de Iniciação Científica UCPel, 2010, Pelotas. *Anais do 19th Congresso de Iniciação Científica UCPel*, 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

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

10/03/2024, 11:55

Currículo Lattes

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-metilpiperazônio e do 4-metilpiperônio benzotriazolado na atividade da acetilcolinesterase em linfócitos de ratos. In: XVII ENPOS - Encontro da Pós Graduação UFPel, 2015, Pelotas.
Anais 2015, 2015.
3. SOARES, M.; DEBOM, G. N.; OLIVEIRA, Patrícia; TAVARES, R.; STEFANELLO, F. M.; SPANEVELLO, ROSELIA
Efeito da administração crônica de metonina e/ou metonina 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 estereozimas 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 dos parâmetros inflamatórios em linfócitos e soro de portadores de Síndrome de Down. 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 metonina e/ou metonina 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.; FERREIRA, M.; DEBOM, G. N.; ORCZY, R.; PERES, W.; SPANEVELLO, R.
Atividade de estereozimas em plaquetas de pacientes com isquemia cerebral submetidos ao exercício passivo. 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 da 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 metonina e metonina 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 METONINA E/OU METONINA 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 ERITRÓCITOS 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 METONINA E/OU METONINA SULFÓXIDO SOBRE PARÂMETROS BIQUÍMICOS 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 CEREBRAL 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, JÉSSICA; 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 NTPDASE 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)

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

5/6

10/03/2024, 11:55

Currículo Lattes

10.  DEBOM, G. N.; SILVEIRA, E. F.; TEIXEIRA, F. C.; RITTER, M.; PEREIRA, C.; BRAGANHOL, E.; SPANEVELLO, 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.; SELVA, K. S.; SCHMATTZ, R.; SPANEVELLO, 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.; GABARDI, G.; PEREIRA, J. L.; KLAPKE, G. B.; GONCALVES, C. X.; BRUM, C. B.; VASCONCELOS, F. A.; PINTO, V. B.; DODE, L. B.
MURAL 0-SKOTEC, 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. (Fóde Social, Mídias sociais, websites, blogs)

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