

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

Células Tronco Tumorais e o Sistema Purinérgico

Pítia Flores Ledur

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Guido Lenz

Porto Alegre, Fevereiro de 2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que fizeram parte desta conquista,

Ao meu orientador, Guido Lenz, pelas discussões científicas, pela compreensão nos momentos de crise, e pelos chimarrões e doces com os colegas do laboratório 107.

Aos professores membros da comissão de acompanhamento, professora Fabiana Horn e professor Jeverson Frazzon, pelas sugestões e pela atenção.

À banca, pela disponibilidade e colaboração.

À Silvia Regina Centeno e Luciano Saucedo, pelo auxílio sempre que necessário.

Aos meus colegas de laboratório, que se tornaram muito especiais ao longo desses anos, cada um a seu jeito:

Emilly, fostes essencial na realização deste trabalho. Agradeço ao auxílio técnico e também aos momentos de companheirismo. Ale Pelegrini, sempre disposta a animar o ambiente com seu senso de humor *sui generis*. Pati Lu, uma amiga batalhadora e perseverante. Ale Tamajusuku, sempre querida, companheira e disposta a ajudar, tens a risada mais contagiante do laboratório. Lauren Zamin, tua personalidade forte e teus conselhos me ajudaram a seguir em frente e a crescer não apenas em meu trabalho, mas também como pessoa. Eduardo Chiela, muito solícito e sempre divertido. Andrew Silva, tornou-se um amigo muito especial para mim. José, Fran e Lucas, obrigada por fazerem de nosso laboratório um ambiente agradável. Guma, obrigada pelo jogo de pipetas e pelos sorvetes proporcionados. Agradeço também aos membros honorários e colaboradores: Beta, sempre; Natana, Gio, Carol, Gabi e Luis; todos os colegas do laboratório 103. À Débora Gazzana Flores, pela participação neste trabalho

Agradeço ao Lucas, o melhor amigo que já tive, por tudo o que significou na minha vida. Mana, a melhor amiga desde sempre. Lú e Rô, pás queridas. Lica, Hel e Min, amigas que tenho certeza que levarei para sempre. Mi, Clara, Thaís, Gra, Rodrigo e Cláudio, os maiores presentes que a UFRGS me proporcionou. Ana e Matheus “Cabeçudo”, os vizinhos mais divertidos. Jú, obrigada por me aturar sempre. A todos os

meus amigos, obrigada por fazerem de mim a pessoa que sou hoje, obrigada por estarem comigo em todos os momentos, incondicionalmente. Amo vocês.

Agradeço a toda minha família, em especial meus pais maravilhosos e meu irmão, Mateus, e à minha avó. Vocês são tudo para mim.

Agradeço à FAPERGS, à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Esse trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

*“Oh, my head lay back on the seating
Been so tired, throw away my surrounding
Like the sun and moon take for granted
Soon we move through the flood and we fade away*

*Lie about it,
Cry about it,
We’ll be ok*

*Lean upon me,
I’ll lean upon you,
We’ll be okay”*

Dave Matthews

ÍNDICE GERAL

Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	8
Lista de Abreviaturas	9
Resumo	11
Abstract	12
Introdução	
1. Gliomas	
1.1. Aspectos clínicos e classificação.....	13
1.2. Etiologia.....	14
2. Células tronco tumorais	
2.1. Definição.....	15
2.2. Células tronco tumorais em tumores de cérebro.....	17
3. Sistema Purinérgico	
3.1. Definição.....	20
3.2. Sistema Purinérgico e câncer.....	21
3.3. Sistema Purinérgico e células tronco.....	22
Objetivos	24
Artigo Científico em forma de <i>Short Communication</i>	25
Abstract.....	26
Introduction.....	27
Material and Methods	
1. Cell Culture.....	28
1.1 Soft Agar technique.....	28
2. Sphere formation assay.....	29
3. RT-PCRs.....	29
4. Immunoblotting analysis.....	29
5. Flow citometry.....	30
6. MTT cell proliferation assay.....	30
7. Statistical analysis.....	30
Results and Discussion	

1. Characterization of a tumor stem cell population in the U87 cell line.....	31
2. Cells treated with ATP formed less spheres.....	32
3. Spheres and adherent cells express different purinergic receptors	35
Acknowledgements.....	36
References.....	36
Considerações finais	38
Perspectivas	44
Referências Bibliográficas	45
Anexo 1 – Cultura primária de tumores de pacientes.....	48
Anexo 2 – Characterization of ATP-induced cell death in GL261 mouse glioma cell line (artigo submetido).....	60
Curriculum vitae	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - esquema demonstrando as possíveis origens da célula tumoral em gliomas (adaptado de SINGH 2004). NSC: célula tronco neural; BTSC: célula tronco de tumor de cérebro.....	15
Figura 2 - Estrutura da proteína CD133. Garfos representam sítios de glicosilação. Adaptado de FARGEAS <i>et al.</i> , 2004.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Receptores Purinérgicos em astrócitos, gliomas e células indiferenciadas.....</i>	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	adenosina tri-fosfato
BSA	albumina bovina sérica (<i>bovine serum albumin</i>)
BTSC	célula tronco tumoral de cérebro (<i>brain tumor stem cell</i>)
CAMKII	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
CNS	<i>central nervous system</i>
CSC	<i>cancer stem cell</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> , ou ácido etilendiamino tetra-acético
EGF	fator de crescimento epidermal (<i>epidermal growth factor</i>)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FGF2	fator de crescimento de fibroblastos 2 (<i>fibroblast growth factor 2</i>)
GLAST	<i>glutamate/aspartate transporter</i>
GBM	glioblastoma multiforme
kDa	unidade de medida: quilo-dáton

mM	unidade de medida: milimolar
μM	unidade de medida: micromolar
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NSC	célula tronco neural (<i>neural stem cell</i>)
OCT-4	<i>octamer 4</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – reação de polimerase em cadeia
RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SFB	soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
SVZ	zona subventricular
WHO	organização mundial de saúde (<i>world health organization</i>)

RESUMO

Gliomas são os tumores mais comuns no SNC, apresentando altas taxas de invasibilidade e proliferação, resistência à quimio e radioterapias, e elevados índices de recorrência e morte. As células-tronco tumorais constituem uma minoria dentre as células do tumor, apresentam características de células tronco neurais podendo sofrer diferenciação e auto-renovação. Linhagens celulares de gliomas, como U87, são capazes de produzir tumoresferas quando em alta confluência, que são similares às neuroesferas produzidas por células tronco neurais, e são ricas em células tronco tumorais (CSCs). Em gliomas, CSCs podem ser identificadas por expressarem o marcador de superfície CD133. Receptores purinérgicos estão envolvidos em diversos processos biológicos. O ATP induz respostas celulares como proliferação e diferenciação, e a degradação deste nucleotídeo por células de glioma é lenta, o que resulta no seu acúmulo no espaço extracelular. O objetivo deste trabalho é identificar a população de CSCs em U87 bem como o efeito do ATP na formação de esferas, expressão do marcador CD133, a expressão de genes de receptores purinérgicos e de genes marcadores de células diferenciadas (GLAST e CAMKII) e de células indiferenciadas (CD133 e OCT-4). U87 foram mantidas em condições padrão com 5% de SFB e esferas foram obtidas através de crescimento sobre ágar 1%. RNA total foi extraído de esferas e monocamada, e os genes de interesse foram amplificados em reação de RT-PCR com *primers* específicos. Esferas apresentam uma maior expressão de CD133, visto por citometria e imunodeteção. O mRNA de OCT-4 também foi mais expresso em esferas do que em monocamada, que expressa mais CAMKII e GLAST. ATP em uma concentração final de 100 μ M reduz significativamente o número de esferas formadas ($P < 0.05$) durante um período de 7 dias e também reduz a expressão de CD133. Dentre os receptores purinérgicos, a expressão de P2X₄ foi maior em esferas, e P2X₆ em monocamada. Estes resultados indicam que as esferas possuem componentes de células tronco e que a sinalização purinérgica pode estar envolvida em importantes aspectos da biologia de CSCs.

ABSTRACT

Glioblastoma multiformes are the most aggressive tumors in the CNS and are characterized by high invasion and proliferation rates, as well as for being resistant to chemo and radiotherapies. This leads to one of the worst prognosis among cancers. Cancer stem cells (CSCs) are scarce among the tumor cells, but can undergo differentiation and self-renewal, being fundamental for tumor maintenance. Tumorspheres, which resemble neurospheres, can grow in glioma cell cultures and are rich in CSC. Additionally, CSCs seem to be more resistant to radiotherapy and strategies aimed at differentiating these stem cells have potential to produce less aggressive and more efficient treatment regimes. CSCs have been identified in different tumor types as well as in established cell lines such as the human glioma cell line U87, and are characterized by the presence of the CD133 glycoprotein. Purinergic receptors are stimulated by nucleotides and nucleosides, and are involved in many biological processes, including embryonic development. ATP induces several cellular responses, such as proliferation and differentiation, and it has been demonstrated that the degradation of this nucleotide is slow in glioma cells, which results in its accumulation in the extracellular space. The aim of this work was to characterize the CSC population in U87 and the effect of ATP in sphere formation. Spheres were obtained by plating cells on a thin layer of agar. Tumorspheres presented a higher amount of CD133 marker as analyzed by flow cytometry and western blotting. mRNA expression of OCT-4, a marker of undifferentiated cells, was higher in spheres, while GLAST and CAMKII, markers of differentiated glial and neuronal cells respectively, presented higher expression in the monolayer cells. Cells plated in the presence of ATP 100 μ M formed 54% less spheres ($P < 0.05$) when compared to control and also had a reduced level of CD133 marker. Among the purinergic receptors, P2X₄ expression was higher in spheres, whereas P2X₆ expression was higher in the monolayer. Our results indicate that spheres have components of stem cells and that the purinergic signaling is involved in important aspects of CSC biology.

INTRODUÇÃO

1. Gliomas

1.1 Aspectos clínicos e classificação

Gliomas são tumores cerebrais que surgem no sistema nervoso central (SNC) e que possuem características morfológicas e de expressão gênica similares a glia, podendo apresentar marcadores de astrócitos, de oligodendrócitos, e/ou de suas células precursoras. Tais similaridades permitem que sejam classificados nos subtipos astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas (mistos), de acordo com a predominância histológica observada em microscópio ótico e com análises imunohistoquímicas. Gliomas são também classificados com base em sua histologia e prognóstico em diferentes graus clínicos pela organização mundial da saúde (World Health Organization – WHO), sendo o grau IV correspondente ao tumor de maior malignidade, denominado glioblastoma multiforme (GBM). Lesões de grau II são associadas a períodos de sobrevida de 5 a 15 anos, enquanto que em lesões de grau III a sobrevida média cai para menos de 3 anos, e pacientes com GBM apresentam uma sobrevida média de apenas 1 ano (HOLLAND, 2001). Praticamente todos os gliomas considerados de baixo grau eventualmente evoluem para gliomas de alto grau (HOLLAND, 2001; LOUIS, 2006). Uma classificação atualizada dos tumores do SNC pela WHO pode ser encontrada em Louis, 2007.

Em relação à invasibilidade, tumores astrocíticos (astrocitomas) são agrupados ainda em duas categorias distintas de acordo com a interação que possuem com o microambiente no qual estão inseridos. Astrocitomas podem ser considerados localizados quando apresentam um padrão de crescimento com margens definidas e limitado potencial invasivo, ou difusos quando há infiltração celular além dos limites peri-tumorais e dispersão para locais mais distantes, independentemente do grau clínico. Apesar de todos os tumores astrocíticos serem invasivos, tumores de maior grau (i.e. III e IV) são progressivamente mais proliferativos e resultam em um tempo de recorrência mais curto. Todos os tumores gliais (exceto astrocitomas pilocíticos – grau I de acordo com a WHO) apresentam uma alta frequência de recorrência após o tratamento, seja este cirúrgico, radio ou quimioterápico, e são essencialmente incuráveis. A recorrência

se dá principalmente devido ao comportamento altamente invasivo até mesmo dos tumores de baixo grau (grau II WHO), em que há a migração ativa de células do glioma a partir da massa tumoral principal em direção ao tecido normal do cérebro. As células invasivas em gliomas estão além do alcance das terapias atuais, que se focam no tumor e no ambiente periférico (HOELZINGER *et al.*, 2007).

O diagnóstico correto do subtipo e do grau de um glioma são características importantes para que se defina a estratégia terapêutica a ser adotada. No entanto, o fato de estas classificações levarem em conta principalmente critérios morfológicos, aliado a falta de marcadores específicos, demonstra a importância de um melhor entendimento da biologia molecular dos gliomas de forma a auxiliar tanto na classificação quanto no tratamento e no direcionamento de terapias mais eficientes (SANSON *et al.*, 2004). A nível molecular, há algumas mutações encontradas em gliomas que podem ser correlacionadas ao grau clínico (HOLLAND, 2001).

Glioblastomas multiformes (grau IV de acordo com a WHO) compreendem aproximadamente 60% de todos os tumores gliais e ocorrem em uma frequência de 5 casos a cada 100.000 pessoas (HOELZINGER *et al.*, 2007). Podem ser classificados ainda como primários ou secundários. A maioria dos casos (mais de 90%) é de glioblastomas primários, nos quais não há evidência clínica ou histológica de uma lesão precursora de menor grau de malignidade, e afetam principalmente pessoas mais velhas. Já glioblastomas secundários se desenvolvem através da progressão de astrocitomas difusos de baixo-grau (grau II – WHO), ou de astrocitomas anaplásticos (grau III – WHO), e ocorrem principalmente em pacientes jovens (OHGAKI E KLEIHUES, 2007).

1.2 Etiologia

Em relação à célula que origina o glioma, ainda há muitas controvérsias. Acredita-se que o tumor possa ser originado tanto por uma célula cerebral normal que se desdiferencie, quanto por uma célula-tronco neural (NSC) ou por uma célula progenitora que sofra transformação (SINGH *et al.*, 2004a). Muitos tipos de câncer, inclusive gliomas, assemelham-se a células indiferenciadas no que diz respeito à expressão gênica e a características fenotípicas. Algumas das vias de sinalização que afetam a diferenciação e a proliferação de progenitores gliais encontram-se alteradas em gliomas (HOLLAND, 2001). Estudos histológicos de tumores cerebrais indicam a

ausência da expressão de marcadores de células diferenciadas em tumores iniciais, bem como a presença de Nestina, uma proteína marcadora de NSCs. A heterogeneidade observada em tumores de cérebro também levanta a possibilidade de uma célula de origem multipotente, conforme esquematizado na Figura 1 (SINGH *et al.*, 2004a).

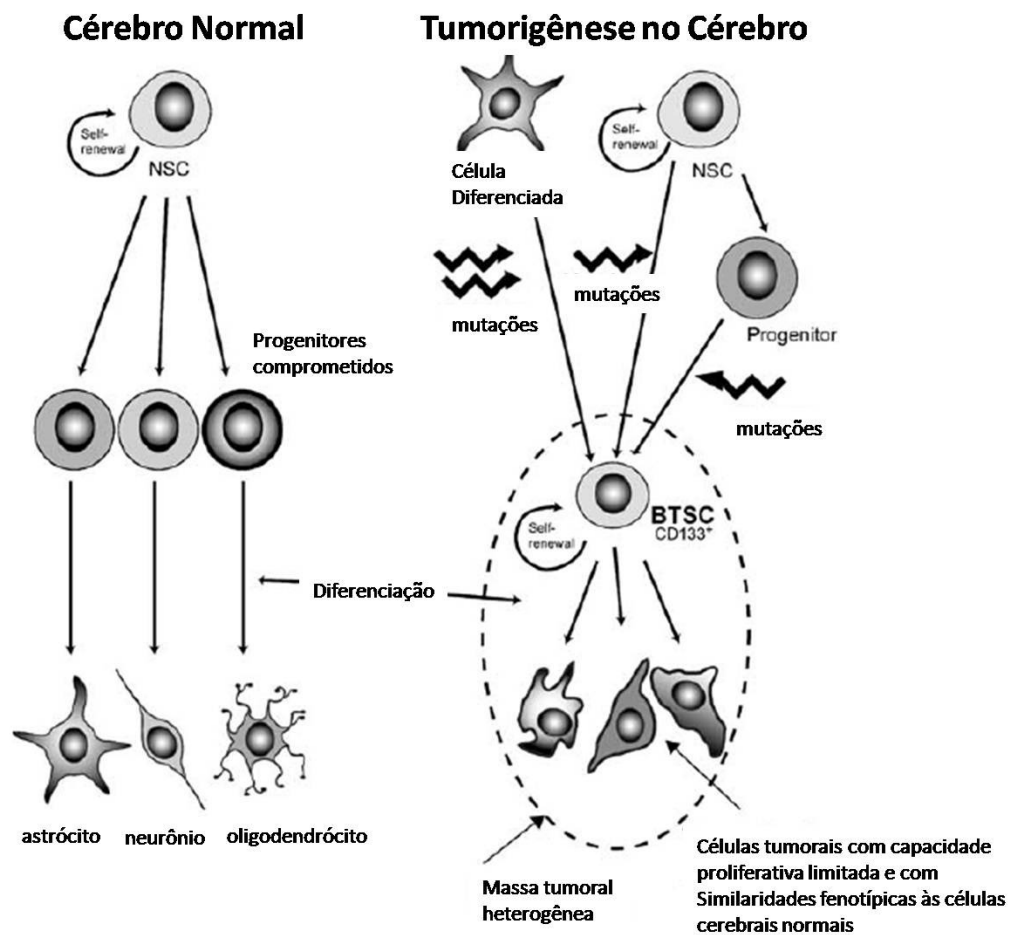


Figura 1 - esquema demonstrando as possíveis origens da célula tumoral em gliomas (adaptado de SINGH 2004). NSC: célula tronco neural; BTSC: célula tronco de tumor de cérebro.

2. Células tronco tumorais

2.1. Definição

A maioria dos tecidos adultos é mantida ao longo da vida de um indivíduo por células tronco que se multiplicam e se diferenciam. Estas células apresentam um processo de auto-renovação bastante regulado que restringe a expansão de células tronco em tecidos normais. A auto-renovação é uma divisão celular na qual uma ou ambas as células filhas permanecem indiferenciadas e retêm a habilidade de originar outra célula tronco com a mesma capacidade de proliferação da célula parental. Alterações envolvendo a regulação da auto-renovação são eventos que podem desencadear o desenvolvimento de câncer. Já foi demonstrado que diversas vias implicadas na carcinogênese também possuem papéis importantes na regulação da auto-renovação de células tronco normais (AL-HAJJ *et al.*, 2004).

A maioria dos tumores leva de meses a anos para se desenvolver, e, assim como os tecidos normais, consiste em populações heterogêneas de células. O crescimento desregulado de tumores, em modelos anteriores, foi atribuído a uma série de eventos genéticos que resultassem na ativação de genes promotores de proliferação, silenciamento de genes envolvidos na inibição da proliferação, e alterações em genes relacionados a apoptose. A descoberta de uma subpopulação de células altamente tumorigênicas e similares a células tronco dentre as células do tumor levou à hipótese das células tronco tumorais (CSCs). Neste modelo, um evento chave envolvido na tumorigênese é a desregulação de genes que atuam na auto-renovação de células tronco. De acordo com esta teoria, os tumores possuiriam (i) células que apresentam ciclos lentos e sofrem auto-renovação por períodos de tempo indefinidos/ilimitados, e (ii) células com um número de divisões celulares finito constituindo a maior parte do tumor (AL-HAJJ *et al.*, 2004; STILES E ROWITCH, 2008). De acordo com esta teoria, as primeiras, embora em menor número, seriam as principais responsáveis pela manutenção do tecido tumoral, e a sua eliminação é necessária e em muitos casos suficiente para a eliminação do tumor.

Apesar das pesquisas e das novas descobertas a respeito das alterações moleculares envolvidas no fenótipo tumoral, a terapia padrão para gliomas continua baseada em estratégias que danificam o DNA, como radiação ionizante e agentes alquilantes (HOLLAND, 2001; SANSON *et al.*, 2004). A principal dedução que pode ser feita a partir da hipótese das CSCs é de que as atuais terapias de combate ao câncer freqüentemente falham porque são direcionadas para os tipos celulares errados (STILES E ROWITCH, 2008). Células tronco tumorais parecem apresentar uma capacidade de

reparar danos ao DNA muito superior às células tumorais não tronco, fazendo com que a radioterapia aumente a proporção de CSCs, levando a um repovoamento rápido do tumor, o que ocasiona recorrência de um tumor muito mais agressivo e radiorresistente (BAO *et al.*, 2006). No tecido normal, há um balanço entre auto-renovação e diferenciação das células tronco somáticas normais, e segundo a hipótese das CSCs o câncer pode ser definido como uma doença da auto-renovação celular (SINGH *et al.*, 2004a).

2.2. Células tronco tumorais em tumores de cérebro

O cérebro adulto é composto por tipos celulares altamente especializados e diferenciados. No entanto, células multipotentes e indiferenciadas, capazes de auto-renovação e caracterizadas por marcadores moleculares específicos estão presentes em baixo percentual no hipocampo, na zona subventricular (SVZ) e nos bulbos olfatórios. São as células tronco neurais (NSCs), que normalmente não estão proliferando mas podem ter sua divisão induzida sob condições de estresse ou de acordo com um programa de desenvolvimento específico. Assim como no cérebro normal, no tumor cerebral também existem muitos tipos celulares. A população celular neural do tumor é heterogênea em sua morfologia e expressão de marcadores específicos, que se relacionam ao estado de diferenciação da célula. Além disso, as células tumorais invadem o tecido normal e muitas vezes usam células deste tecido para criar um nicho celular adequado ao seu crescimento (FOMCHENKO E HOLLAND, 2005). O fato de existirem (i) progenitores neurais adultos identificados e mapeados em regiões espacialmente restritas do cérebro pós-natal, (ii) proteínas e anticorpos marcadores disponíveis para tipos celulares específicos do cérebro adulto, e (iii) protocolos para a cultura de progenitores neurais normais e multipotentes já estabelecidos, fazem dos tumores cerebrais um ótimo modelo de estudo para a hipótese das CSCs (STILES E ROWITCH, 2008).

O isolamento direto de NSCs normais humanas a partir de tecidos por meio da identificação de marcadores de superfície celular e FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) do sistema nervoso central ou periférico foi realizado pela primeira vez por Uchida e colaboradores em 2000. Neste trabalho, foram utilizados anticorpos monoclonais para o reconhecimento de CD133, uma proteína originalmente identificada

como marcadora de células tronco hematopoiéticas, mas mais recentemente considerada como marcadora de NSCs normais humanas. A CD133 possui entre 97 e 120 kDa, dependendo de sua glicosilação, e apresenta 5 domínios transmembrana (5-TM), sendo conhecida também como prominina 1 (PROM1) (Figura 2). As células CD133+ isoladas apresentam capacidade de iniciar neuroesferas, de auto-renovação e de diferenciação a partir de uma única célula. Neuroesferas são agrupamentos de células originados a partir de uma célula tronco que formam complexos *in vitro*, sendo compostas por uma mistura heterogênea de células tronco, células progenitoras e um pequeno número de células diferenciadas (DIAMANDIS *et al.*, 2007; UCHIDA *et al.*, 2000).

A descoberta de CSCs no cérebro foi feita por meio do emprego de técnicas de cultura celular e de análises das NSCs em populações de células tumorais de cérebro e pela identificação de marcadores de superfície celular que permitem o isolamento de populações celulares distintas dentre o tumor. A identificação de células tronco tumorais cerebrais (BTSCs) possibilita a investigação do processo tumorigênico no SNC e o desenvolvimento de terapias que tenham como alvo estas CSCs (SINGH *et al.*, 2004a; Diamandis *et al.*, 2007). A proteína CD133 foi também encontrada em populações de células tronco tumorais, passando a ser considerada marcadora destas (SINGH *et al.*, 2003).

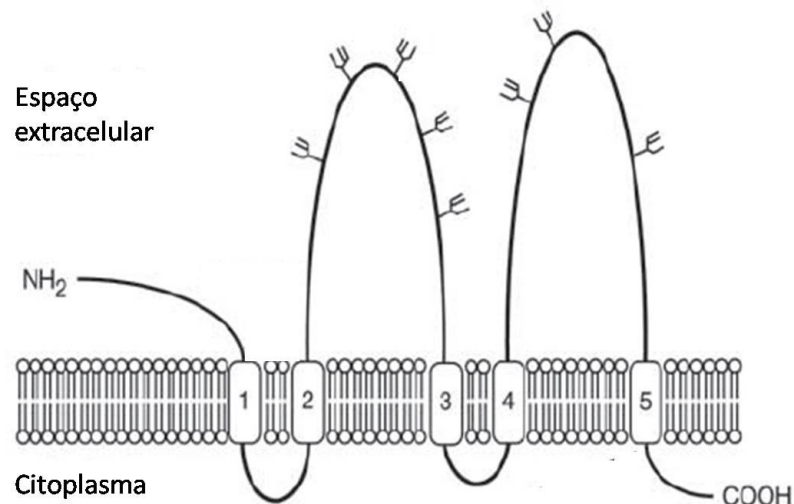


Figura 2 - Estrutura da proteína CD133. Garfos representam sítios de glicosilação. Adaptado de FARGEAS *et al.*, 2004.

Células CD133+ isoladas de tumores primários de cérebro humano constituem uma população com elevada capacidade de proliferação, auto-renovação e diferenciação, e são minoria na população de células tumorais. As células tronco encontradas em leucemias, por exemplo, constituem uma população rara com elevada capacidade de proliferação e de auto-renovação que não é encontrada na maioria das células leucêmicas. No entanto, apesar de rara, esta população é necessária e suficiente para a manutenção da leucemia. Em neuroesferas de um cérebro normal, menos de 1% das células são tronco, sendo o restante composto principalmente por células progenitoras com capacidade restrita de auto-renovação e de potencialmente originar outras linhagens (SINGH *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que subpopulações de células de GBM humano adulto também formam esferas em cultura. Estas esferas são capazes de auto-renovação e diferenciação multipotente, mas diferem de neuroesferas normais por serem capazes de formar novas esferas mesmo após a indução da diferenciação. Estas esferas, quando injetadas em camundongos *nude*, formam tumor, enquanto que as células derivadas de células aderentes não são capazes de formar tumor (YUAN *et al.*, 2004). Tumoresferas, como passaram a ser chamadas, são definidas como colônias não-aderentes derivadas de uma única célula-tronco tumoral. Em trabalho de Singh e colaboradores, em 2003, as tumoresferas primárias, originadas de tumor cerebral, foram dissociadas e apresentaram capacidade de formar tumoresferas secundárias, e esta auto-renovação mostrou-se maior em tumores mais agressivos. Além disso, somente células CD133+ apresentaram esta capacidade. As tumoresferas, tanto primárias quanto secundárias, apresentaram expressão de nestina e de CD133, marcadores de células indiferenciadas, e quando tiveram sua diferenciação induzida pela presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo, passaram a expressar os marcadores de células neurais diferenciadas GFAP (para astrócitos) e β -tubulina 3 (para neurônios). Estes marcadores refletem a expressão que havia sido observada nas células do tumor original, o que indica a recapitulação *in vitro* do fenótipo tumoral (SINGH *et al.*, 2003). Posteriormente, o isolamento de células CD133+ a partir de tumores de pacientes e sua injeção em camundongos NOD-SCID (*non-obese diabetic, severe combined immunodeficient*), demonstrou a capacidade destas células em originar tumor. O mais intrigante é que a injeção de apenas 100 células CD133+ foi capaz de produzir um tumor que era uma fenocópia do tumor original do paciente, ao passo que a injeção de 100.000 células CD133- nestes camundongos não produziu tumor (SINGH *et al.*,

2004b). Para completar o quadro, a fração de células tronco tumorais expressando CD133 em gliomas é enriquecida após exposição à radiação ionizante, passando de 2-3% para 6-10%. Este aumento na proporção de células tronco em gliomas resulta em menores períodos de latência e elevados crescimento tumoral e vascularização, o que pode ser relacionado à radiorresistência e aos altos índices de recorrência observados nestes tumores (BAO *et al.*, 2006).

CSCs, conforme anteriormente mencionado, já foram identificadas e purificadas a partir de tumores líquidos e sólidos. No entanto, a maioria destes isolamentos foi feita a partir de amostras clínicas. Mais recentemente, foram identificadas células tronco tumorais também em linhagens celulares estabelecidas. No caso de gliomas, estes isolamentos foram feitos na linhagem de rato C6, e nas linhagens humanas A172, U373, e U87. A linhagem U87, que foi utilizada no presente trabalho, apresenta duas populações descritas, sendo uma de células aderentes, e outra capaz de formar esferas em cultura. Estas esferas são ricas em células tronco tumorais e se mostraram capazes de formar tumores com características típicas de GBM quando implantadas em camundongos imunocomprometidos (YU *et al.*, 2008).

3. Sistema Purinérgico

3.1. Definição

O Sistema Purinérgico tem importante participação em diversos processos biológicos. A sinalização purinérgica está bem estabelecida nas sinalizações rápidas envolvidas em neurotransmissões, mas também em outros tecidos e respostas biológicas diversas, como proliferação celular, diferenciação e apoptose. Nucleotídeos e nucleosídeos podem ser reconhecidos pelos receptores purinérgicos e regular funções patofisiológicas em diversos tecidos. Os purinoceptores podem ser divididos em receptores do tipo P1, que possuem a adenosina como principal ligante, ou em receptores do tipo P2, com ATP e ADP como os principais ligantes. Os receptores do tipo P2 se subdividem ainda em P2X (ionotrópicos) e P2Y (metabotrópicos). Até o momento, sete receptores P2X e oito receptores P2Y foram clonados e caracterizados (WHITE E BURNSTOCK, 2006).

Os receptores P2X são canais de cátions não seletivos, cuja ativação resulta em influxo de Na^+ e Ca^{2+} e efluxo de K^+ através da membrana plasmática, levando à despolarização e ao aumento das concentrações intracelulares de Na^+ e Ca^{2+} . A despolarização pode promover o disparo de potenciais de ação em neurônios. Os receptores do tipo P2Y possuem diversos ligantes endógenos. Vias de transdução de mensageiros secundários têm sido implicadas na sinalização deste receptor, como a ativação de fosfolipase C (PLC), a inibição e a estimulação de adenil ciclase, a ativação das vias das MAPKs (LENZ *et al.*, 2000; JACQUES-SILVA, 2004), e a modulação direta da função dos canais iônicos (WHITE E BURNSTOCK, 2006).

Há importantes mecanismos envolvidos no controle da concentração de ATP extracelular. As ecto-nucleotidases são enzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e na formação de nucleosídeos, possuindo, portanto, um papel chave na regulação da sinalização purinérgica. As ecto-nucleotidases compreendem diversas famílias de enzimas. As NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) são capazes de hidrolisar tri- e di-fosfonucleotídeos extracelulares, e já tiveram pelo menos 8 enzimas relacionadas clonadas e caracterizadas em mamíferos (NTPDases 1-8). Alterações relacionadas à atividade das NTPDases têm sido descritas em patologias, como em células tumorais de diferentes origens. Há ainda as enzimas da família NPP (nucleotídeo pirofosfatases), as fosfatases alcalinas, as ecto-5'-nucleotidases, e as nucleosídeos difosfoquinases (NDPK) (WINK *et al.*, 2003; WHITE E BURNSTOCK, 2006).

3.2. Sistema Purinérgico e Câncer

Diversos trabalhos já demonstraram que nucleotídeos de adenina possuem ação anti-câncer. A injeção de ATP resultando em concentrações de 3-5 μM no plasma circulante, de 1 a 5 horas após a injeção, inibiu o crescimento tumoral em camundongos com tumores de cólon. A ação sinérgica do ATP quando administrado junto com agentes quimioterápicos ou radioterapia também já foi reportada (WHITE E BURNSTOCK, 2006). Nucleotídeos e nucleosídeos, em algumas linhagens de glioma, atuam induzindo a proliferação celular (MORRONE *et al.*, 2003). ATP induz a morte celular de neurônios em culturas primárias e organotípicas; no entanto, gliomas parecem ser imunes a essa citotoxicidade (MORRONE *et al.*, 2005). A concentração intracelular

de ATP é de 5-10 mM na maioria das células, e, em gliomas, a morte celular de células normais do tecido adjacente pode ocorrer por necrose, por excitotoxicidade da população neuronal mediada por receptores ionotrópicos de glutamato que modulam a liberação de purinas, ou por danos causados pela ressecção cirúrgica do tumor, elevando assim as concentrações extracelulares de ATP a níveis de milimolar (similar às concentrações que induzem a morte celular em culturas organotípicas). Desta forma, certas concentrações de ATP são capazes de matar o tecido sadio em contato com o tumor, e estimular o crescimento das células do glioma (MORRONE *et al.*, 2005).

Nucleotídeos extracelulares são sinalizadores importantes tanto em condições fisiológicas quanto em condições patológicas. O ATP extracelular pode ser degradado em ADP, AMP, e finalmente em adenosina, que é absorvida pela célula. A adenosina possui efeitos neuroprotetores, e é capaz de induzir angiogênese e proliferação. O ATP é considerado estimulatório e até mesmo citotóxico. Em gliomas, a degradação de ATP ocorre muito lentamente quando comparada a astrócitos, resultando em um acúmulo de ATP extracelular. Isso se dá por meio da redução na capacidade de hidrólise de nucleosídeos di- e tri-fosfatados nos gliomas (WINK *et al.*, 2003). Estes resultados se confirmam em trabalho posterior, no qual a injeção de apirase, uma enzima que hidrolisa ATP e ADP, reduz o tamanho tumoral em modelos experimentais de glioma C6 de rato (MORRONE *et al.*, 2006). No entanto, o restabelecimento da expressão/atividade de NTPDase 2 em gliomas do tipo C6 aos níveis observados em astrócitos levou a um aumento da massa tumoral *in vivo* de aproximadamente 200%, provavelmente por favorecer a hidrólise de ATP e o acúmulo de ADP, afetando os receptores do tipo P2 (BRAGANHOL *et al.*, submetido).

3.3. Sistema purinérgico e células tronco

A importância da sinalização purinérgica no desenvolvimento embrionário e pós-natal está se tornando cada vez mais evidente, e a expressão transitória dos subtipos de purinoceptores sugere que eles estejam envolvidos na proliferação, diferenciação e morte celular ao longo do processo de desenvolvimento. Estudos envolvendo o sistema purinérgico em células tronco estão apenas começando, e muitos estudos ainda são necessários (BURNSTOCK, 2008). O desenvolvimento do cérebro é um dos eventos morfogenéticos mais importantes que ocorrem no embrião. A expressão e a atividade de

receptores purinérgicos estão presentes não apenas no cérebro adulto, mas também em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, sugerindo um papel destes receptores na embriogênese. Purinoceptores são essenciais em processos como a proliferação e a migração de oligodendrócitos progenitores no SNC, o controle da neurogênese no hipocampo e a direção dos eventos de migração devido aos papéis tróficos do ATP extracelular em neurônios e astrócitos. Nucleotídeos participam também na indução de proliferação mediada por fatores de crescimento. A liberação constitutiva de ATP e a ativação do receptor P2Y₁ parecem aumentar a proliferação de neuroesferas induzida por EGF e FGF2. Em neuroesferas, receptores P2Y₁ têm o maior impacto na sinalização por Ca²⁺, com grande participação dos receptores P2Y₂ (RESENDE *et al.*, 2007).

A linhagem celular P19 é um modelo de célula pluripotente de carcinoma embrionário murino, que pode ser diferenciada originando derivados da neuroectoderme capazes de expressar marcadores neuronais similares aos encontrados *in vivo*. Além disso, esta linhagem expressa endogenamente praticamente todos os subtipos de receptores purinérgicos. No trabalho de Resende e colaboradores, em 2007, foi utilizada a linhagem P19 para analisar a expressão de purinoceptores a partir de estágios embrionários até a diferenciação em precursores neurais e neurônios com receptores funcionais. Foi constatado que a expressão gênica e protéica dos receptores P2X₂, P2X₆, P2Y₂ e P2Y₆ cresce ao longo do processo de diferenciação, enquanto que a expressão de P2X₃, P2X₄, P2Y₁ e P2Y₄ decresce. Em células indiferenciadas, os receptores ionotrópicos P2X foram os que mais contribuíram para a sinalização por cálcio induzida por ATP, enquanto que nas P19 diferenciadas mais de 50% da mobilização de cálcio induzida por ATP foi devida à ativação de receptores metabotrópicos do tipo P2Y. Provavelmente, a inibição de P2Y₁ e a ativação de P2X₂ ao longo da diferenciação culminaram em perda da resposta de cálcio induzida pelo receptor NMDA. Os receptores P2X₂ e P2Y₂ são necessários para a manutenção dos receptores colinérgicos em neurônios diferenciados. A presença de P2Y₁ já foi observada também em células mesenquimais indiferenciadas, desaparecendo ao longo do processo de diferenciação, e em células tronco hematopoiéticas, onde ocorre também a expressão de P2Y₂.

OBJETIVOS

A proposta deste trabalho é analisar o papel do sistema purinérgico na formação de esferas na linhagem celular de glioma humano U87. As esferas observadas em cultura são similares às neuroesferas produzidas por células tronco neurais, e já foram descritas em gliomas como contendo uma população de células tronco tumorais (SINGH *et al.*, 2004b).

Entre os objetivos específicos deste estudo estão:

- Caracterizar a presença de células tronco tumorais na linhagem celular U87
- Avaliar o papel do ATP na formação de esferas em cultura
- Correlacionar a expressão gênica de receptores purinérgicos com a expressão de genes marcadores de células diferenciadas e indiferenciadas em culturas com predomínio de monocamada ou de esferas

Purinergic signaling affects tumorspheres growth and cancer stem cell population in U87 human glioblastoma

Pítia Flores Ledur ¹

Emilly Schlee Villodre ¹

Débora Gazzana Flores ²

Romela Paulus da Rosa

Lavínia Almeida Cruz ¹

Guido Lenz ¹ *

¹ *Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

² *Laboratório de Pesquisas em Câncer, Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil*

*Corresponding author: Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43431, sala 107, Campus do Vale, CEP 91501-970. Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone number: 55.51.33087620

Email address: lenz@ufrgs.br

ABSTRACT

Glioblastoma multiformes are the most aggressive tumors in the CNS and are characterized by high invasion and proliferation rates, as well as for being resistant to chemo and radiotherapies. This leads to one of the worst prognosis among cancers. Cancer stem cells (CSCs) are scarce among the tumor cells, but can undergo differentiation and self-renewal, being fundamental for tumor maintenance. Tumorspheres, which resemble neurospheres, can grow in glioma cell cultures and are rich in CSC. Additionally, CSCs seem to be more resistant to radiotherapy and strategies aimed at differentiating these stem cells have potential to produce less aggressive and more efficient treatment regimes. CSCs have been identified in different tumor types as well as in established cell lines such as the human glioma cell line U87, and are characterized by the presence of the CD133 glycoprotein. Purinergic receptors are stimulated by nucleotides and nucleosides, and are involved in many biological processes, including embryonic development. ATP induces several cellular responses, such as proliferation and differentiation, and it has been demonstrated that the degradation of this nucleotide is slow in glioma cells, which results in its accumulation in the extracellular space. The aim of this work was to characterize the CSC population in U87 and the effect of ATP in sphere formation. Spheres were obtained by plating cells on a thin layer of agar. Tumorspheres presented a higher amount of CD133 marker as analyzed by flow cytometry and western blotting. mRNA expression of OCT-4, a marker of undifferentiated cells, was higher in spheres, while GLAST and CAMKII, markers of differentiated glial and neuronal cells respectively, presented higher expression in the monolayer cells. Cells plated in the presence of ATP 100 μ M formed 54% less spheres ($P < 0.05$) when compared to control and also had a reduced level of CD133 marker. Among the purinergic receptors, P2X₄ expression was higher in spheres, whereas P2X₆ expression was higher in the monolayer. Our results indicate that spheres have components of stem cells and that the purinergic signaling is involved in important aspects of CSC biology.

Keywords: Glioma, cancer stem cells, CD133, purinergic system, ATP

INTRODUCTION

Gliomas are the most common brain tumors, characterized by its highly invasive and recurrent potential, with patients presenting a median survival that does not exceed 15 months, despite modern treatments (Demuth & Berens, 2004). Despite recent therapeutic improvements, the overall survival has not changed very much in the last 20 years (Hoelzinger et al, 2007), which may be, in part, due to the targeting of the wrong cell subtypes in the tumor cell population (Stiles & Rowitch, 2008). Ionizing radiation, for instance, has been shown to kill more efficiently the differentiated glioma cells due to a more efficient repair in the cancer stem cells (CSCs), therefore leading to an increasing proportion of these cells in the tumor and a more aggressive tumor recidive (Bao et al, 2006).

Cancer stem cells possess stem cell properties such as self-renewal, which seems to be essential for the maintenance of tumors (Al-Hajj et al, 2004). Yuan et al., 2004, isolated a subpopulation of human adult GBM cells that formed spheres in culture. These spheres were capable of self-renewal and multipotent differentiation, but they also differed from normal neurospheres for being able to form new spheres after the induction of differentiation. This type of spheres observed in culture was already described in gliomas as containing a population of CD133+ cancer stem cells, and are called tumorspheres. When isolated from patients and injected in NOD-SCID mice, only CD133+ cells were apt of originating a tumor (Singh et al, 2003; Singh et al, 2004). Recently, tumor stem cells have also been found in established cell lines, such as the human glioma cell lines A172, U373 and U87, and the rat glioma cell line C6. In U87, two distinct cell populations were described, one consisting of adherent cells, and the other competent of forming spheres in culture. These spheres produce tumors with typical GBM characteristics when implanted in immunocompromised mice (Yu et al, 2008).

Purinergic receptors can be activated by ATP and other nucleotides, and present many functions, including neurotransmission and neuromodulation in synapses. The expression of purinergic receptors has not only been reported in the adult brain, but also in stages of embryonic development, which suggest a role for these receptors during embryogenesis. ATP induces several cell functions, like proliferation and differentiation, and the constitutive release of ATP and the activation of P2Y₁ receptor

seem to increase the proliferation of neurospheres derived from embryonic tissue induced by EGF and FGF (Resende et al, 2007). The concentrations of ATP are tightly regulated in order to maintain the homeostasis of biological processes, and alterations may lead to pathologies. Most cells have an intracellular concentration of ATP that ranges from 5 to 10 mM, and cell death of normal cells by necrosis or by damage caused by surgical interventions may increase the extracellular amounts of ATP in the context of a glioma. This allows the glioma cells to grow as the normal tissue around it collapses (Morrone et al, 2005). In gliomas, the degradation of ATP is slow in comparison to astrocytes (Wink et al., 2003), leading to an accumulation of extracellular ATP in the peritumoral space which may induce proliferation of gliomas (Morrone et al., 2003). No study has addressed, however, the impact of nucleotides and nucleosides in CSCs.

Here we show that purinergic receptors are differently expressed in tumorspheres and adherent cells. Furthermore, ATP reduces the growth of tumorspheres and the intensity of CD133 staining.

MATERIAL AND METHODS

1. Cell culture

Human glioma cell line U87 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Cells were maintained in complete medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose (Gibco BRL) containing 2% (w/v) L-glutamine and 5% (v/v) fetal bovine serum (FBS – Gibco BRL), 5% CO₂/95% air at 37°C. Fungizone and peniciline/streptomycine (Gibco BRL) were added to the medium.

1.1 Soft agar technique

A thin layer of 1% agar was used to cover the plates. Cells were plated and allowed to grow in standard conditions in 5% FBS as described previously. Cells that were grown in agar were non-adherent and formed only spheres. Medium was changed

every 2-3 days. Not all the cells grown over the agar layer were colony forming cells, so the replacement of the superficial medium allowed the cell clusters (forming spheres) to sediment, and single cells to be washed away. After about 10 days, U87 cells grown in soft agar consisted of basically only spheres.

2. Sphere formation assay

Exponentially growing cells were detached from the culture flasks with EDTA-trypsin and counted in Neubauer chamber. Different numbers of U87 cells (250, 500, 750 and 1000) were then plated in a 96-well plate with 200 μ L/well of DMEM low glucose medium supplemented with 5% FBS and allowed to grow to confluence for 7 days. In the treatment, ATP (Sigma Chemical Co. - St. Louis, MO, USA) was added in order to obtain a final concentration of 100 μ M. Spheres were counted from days 3 till 7, and during this period medium was not changed. We considered as spheres groups of cells that presented volume of more than 60 μ m observed in phase contrast.

3. Flow cytometry

Spheres were obtained from agar coated plates grown for 7 days and monolayer cells were obtained from cultures in which 30,000 cells plated in a 3,5cm plate grown for 7 days, which represents the same confluence as 1000 cells in a 96-plate well. Cells were mechanically dissociated, washed twice in a solution of EDTA 2 mM in PBS containing 0.5% BSA and then incubated with anti- CD133/1 (AC133)-APC antibody (Miltenyi Biotec, Germany) 1:10 for ten minutes at 4 °C in the dark. Cells were then analyzed by flow cytometry in a PCA-96 System machine (Guava Technologies, Hayward, CA, USA). Cells from ATP treatment and control were also analyzed.

4. RT-PCRs

In order to ascertain that the monolayer and sphere populations were as pure as possible, we grew U87 cells at low confluence so that no spheres were present, and grew cells on a soft agar, isolating only spheres by decantation. mRNA was extracted from the two U87 populations (spheres and adherent cells) using Trizol LS® reagent

(Gibco). cDNA was synthesized with Oligo(dT) primers and MMLV-RT® reverse transcriptase enzyme (Promega). Primers designed in our laboratory for marker genes CD133 and OCT-4 (undifferentiated cells), GLAST (differentiated cells from glial origin) and CAMKIIa (differentiated cells from neural origin) and purinergic receptor genes P2X₁₋₇, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁₋₁₄ were used in the PCR reaction. Products were analyzed in an agarose gel (1%) stained with 0,5x SYBR Green for gel staining (Molecular Probes).

5. Immunoblotting analysis

For Western Blot (WB), cells were lysed by a lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 mM β-glycerophosphate, 1% Triton-X 100, and protease inhibitors without EDTA from Roche, Germany). Lysates from control and ATP, as well as from spheres grown in agar plates and cells from the monolayer were used for WB. Protein content of preparations was assessed by the Lowry method using bovine serum albumin (BSA) solution as standard. 40 μg of proteins were separated on polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and were electrically transferred to a PVDF membrane (Perkin Elmer). Membranes were then blocked in a 5% non-fat dry milk solution in TBS supplemented with 0.1% tween 20, pH 7.5. Primary and secondary antibodies were incubated for 1 hour each at room temperature. The primary antibody used was anti-CD133 (Cell Signaling, 1:1000). The secondary antibody used was horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:2000, Jackson Immune Research). Chemiluminescence was detected in X-ray films, according to the manufacturer's instructions (KodakX-Omat, Rochester, NY).

6. MTT cell proliferation assay

MTT reduction was performed according to Mosmann, 1983. After 7 days of treatment, culture medium in the 96-well plate used for the “spheregenic assay” was replaced by the MTT solution dissolved in PBS, and the plate was incubated at 37°C for 3 hours. The MTT solution was then aspirated and the formazan crystals formed were dissolved in DMSO. Absorbance was read at 570 nm and the growth inhibition in treated cells was expressed as a percentage of the untreated control cells.

7. Statistical analysis

The level of significance was determined by a two-tailed Student's t-test (GraphPad InStat3 software). All quantitative data presented are the mean \pm s.d. from at least three samples per data point.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Characterization of a tumor stem cell population in the U87 cell line

The U87 human glioma cells grown on high density present two morphologically distinct populations, one that consists of cells attached to the plate as a monolayer, and a population that grows as spheres that resemble neurospheres. Induction of tumor-sphere growth *in vitro* is normally achieved by using specific growth factors in the culture medium instead of serum. In our hands, though, spheres were readily observed even when grown in the presence of 10% FBS. In order to optimize sphere formation in culture, we plated U87 cells with different concentrations of serum and observed that the amount of spheres formed was the highest at 5% FBS, whereas serum concentrations lower than 5% restricted cell culture.

Spheres were described to be richer in tumor stem cells when compared to cells grown in a monolayer and therefore these cells are thought to be more differentiated. Accordingly, spheres presented more CD133+ cells when compared to the monolayer, both when analyzed as a cell population by flow cytometry as well as by western blotting (Fig. 1 A and B). The expression of markers of differentiation also confirmed this observation, since expression of Octamer-4 (OCT-4), a marker of embryonic stem cells, was observed only in spheres whereas the monolayer population presented more expression of GLAST, a marker for differentiated cells of glial origin and of CAMKII, a neuronal marker (Fig 1C). These results suggest that, despite grown in the presence of serum, U87 glioma stem cells form tumorspheres that present characteristics that are similar to gliomas grown on selected growth factors. Our results are consistent with the idea that the spheres comprise the cancer stem cell population, presenting the cancer stem cell protein CD133 and other markers that are characteristically expressed in undifferentiated cells. The percentage of CD133+ observed in glioma tumorspheres is quite broad, with primary cultures of brain tumors or cell lines presenting from 1% to

about 50% (Yu et al., 2008, Singh et al, 2003, Bao et al., 2006). Our analysis indicates that the percentage of CD133+ cells in the tumorspheres is around 30% (Fig. 1A).

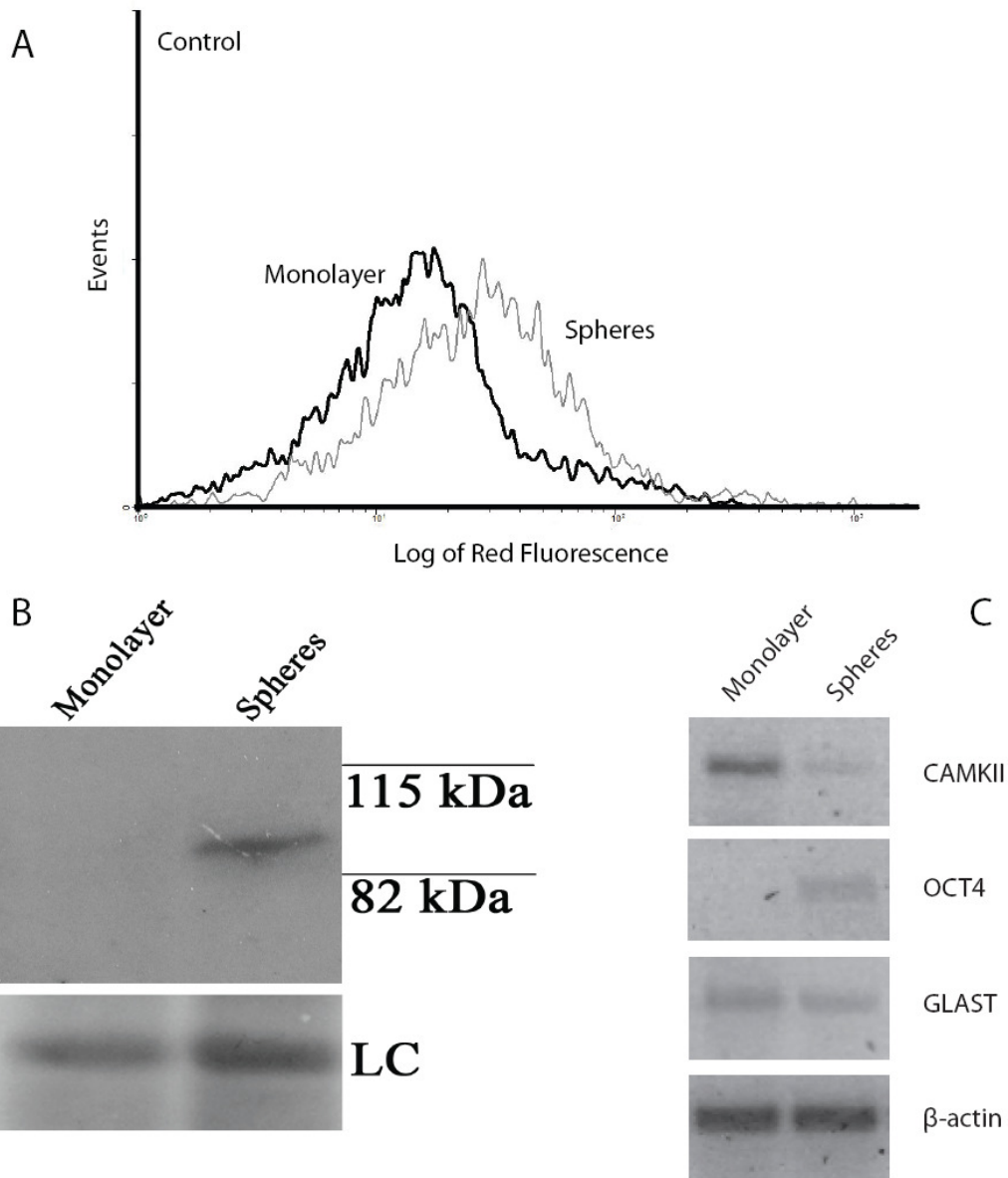


Figure 1 – Characterization of tumorspheres. Cells from tumorspheres and adherent cultures were analyzed by flow cytometry using anti-CD133 antibody (representative of 3 independent experiments) (A), western blotting with anti-CD133 (representative of 2 independent experiments) (B) and RT-PCR using primers to markers of undifferentiated cells (Oct4) and of differentiated cells (Glast and CaMKII) (representative of 5 independent experiments) (C). LC: loading control.

2. Cells treated with ATP formed fewer spheres

In the sphere formation assay, cells were plated with and without ATP at a final concentration of 100 μ M, and the number of spheres formed was counted from day 3 to

7 after plating. In the presence of ATP, there were significantly fewer spheres ($P < 0.05$) at days 4, 5 and 7 for 750 cells plated. When we considered the plating of 1000 cells, there were significantly fewer spheres in all days evaluated (Figure 2A).

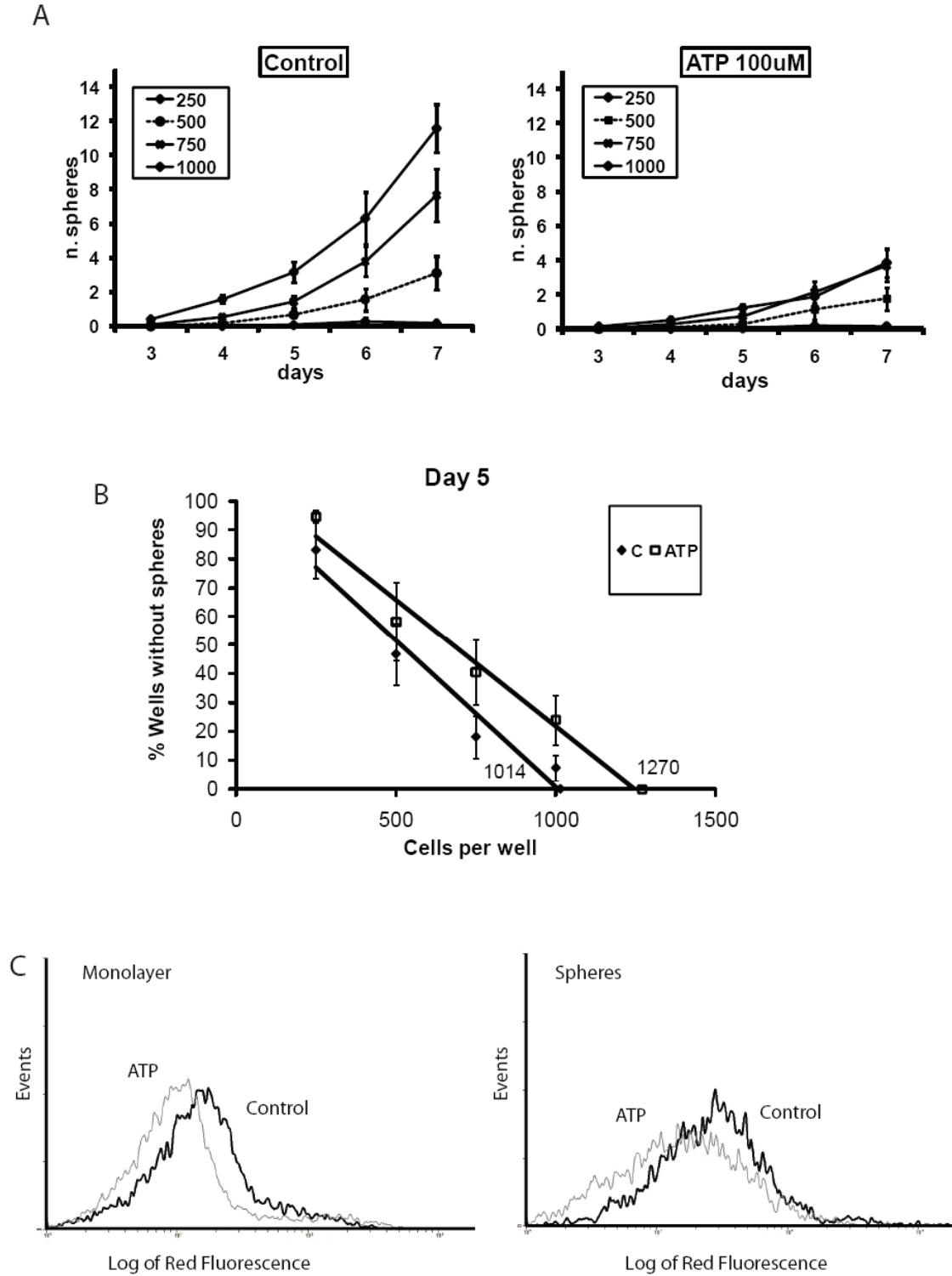


Figure 2 – Treatment with ATP reduces the tumorspheres and stem cell population. Cells were grown for 7 days and spheres were analyzed from day 3 to 7 in the absence or presence

of 100 μ M of ATP (average + SEM) (n=6) (A). Regression analysis of the wells without spheres (B). Flow cytometry using anti-CD133 of cells growth for 7 days in the presence or absence of ATP in soft agar plates (spheres) or adherent plates (representative of 3 independent experiments) (C).

Since long term treatments can affect proliferation, we evaluated the total amount of cells at the end of the treatment by performing the MTT assay. We observed that cells treated with ATP 100 μ M presented reduced growth. Since cell number was affected, the number of spheres formed was corrected for cell proliferation in order to evaluate the real effect of ATP in the reduction of sphere formation. Even after correction, the number of spheres was lower in the presence of ATP (Table 1).

Table 1 – Number of spheres formed at day 7 in control and ATP treatments, corrected by MTT. Values expressed as average \pm SEM (n=4).

Number of Spheres/MTT	250	500	750	1000
Control	0.2 \pm 0.1	3.6 \pm 1.1	8.8 \pm 1.1	12.6 \pm 0.4
ATP	0.2 \pm 0.1	2.1 \pm 1.0	4.5 \pm 0.9	5.8 \pm 1.5

Cells treated with ATP presented less CD133+ staining when compared to control, indicating that ATP reduces the expression of CD133 in glioma cells (Fig. 2C). Another way of accessing the relative presence of sphere-forming cells in a population is to calculate a linear regression of the percentage of wells without spheres (Singh et al, 2003). The mean x-intercept value of the graph indicates the number of cells needed to form one sphere per well, which was higher in the ATP-treated cell (1270) when compared to the control (1014), suggesting that ATP reduces the relative number of cells capable of forming spheres in the population (Fig. 2B). Adenosine, on the other hand, reduced the number of cells needed to form a sphere per well (708), suggesting that nucleotides and nucleosides can have opposing effects on the CSC population. This points to an important role of ecto-enzymes in CSCs. Other nucleotides, such as ADP and UTP did not significantly influence in the number of spheres (data not shown).

3. Spheres and adherent cells express different purinergic receptors

We wondered whether components of the purinergic system are differently expressed in glioma cells that form spheres and in cells that are adherent on culture dish. We observed the expression of P2X₆ and P2X₇ predominantly in cells from the monolayer, whereas P2X₄, P2Y₁₃ and P2Y₁₄ were more expressed in spheres (Fig 3).

Little is known about the expression of purinergic receptors in undifferentiated cells. Resende et al (2007) studied the alteration of expression of the purinergic receptors in P19 embryonal carcinoma cells before and after differentiation. Among the receptors differently expressed in spheres and monolayer, Resende et al found more expression of P2X₄ in undifferentiated cells, which was also more expressed in glioma tumorspheres and more P2X₆ after cell differentiation, which correlates with the higher expression observed in cells present in the monolayer in our experiments. Whether the activation of these receptors plays a role in CSC differentiation remains to be shown.

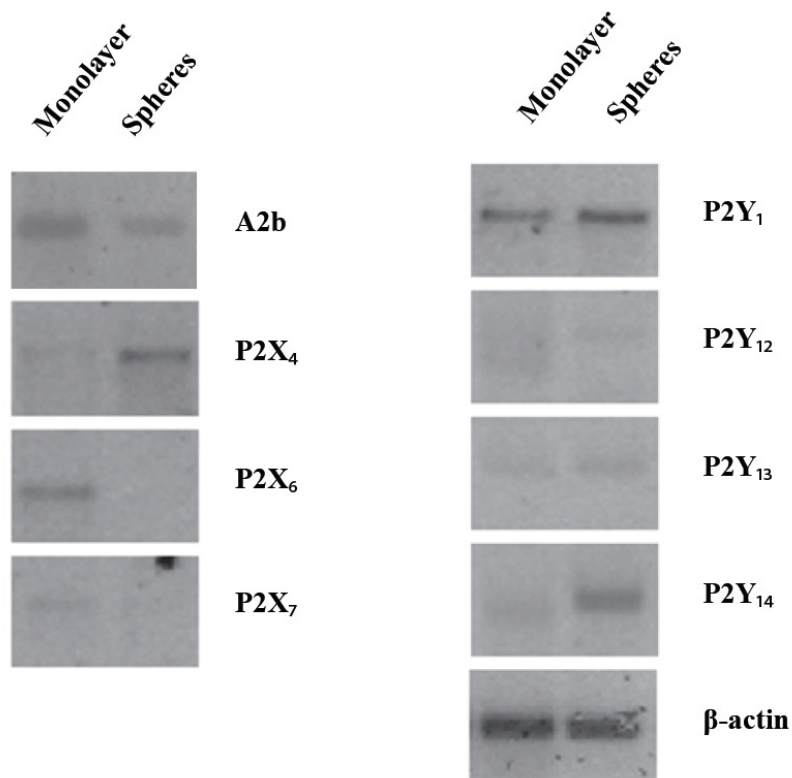


Figure 3 – Different purinergic receptors are expressed in spheres and adherent cells.

Several inhibitors of neurosphere proliferation were evaluated in a broad chemical screen made by Diamandis et al, 2007, and several compounds presented inhibitory effects on the proliferation of cultures enriched for brain cancer stem cells. These chemicals induced different neurosphere phenotypes, altering for example sphere number, size and adhesion properties. Appropriate neurotransmission signaling seems to be required in neural stem cell maintenance, and chemical compounds that affect dopaminergic, cannabinoid and purinergic receptors, among others, influenced the formation of neurospheres and tumorspheres (Diamandis et al., 2007). Therapies that affect differentiation can also affect tumor malignity, and should therefore be explored as treatment alternatives.

ATP induces several cellular responses, such as proliferation and differentiation, and in our work it has been shown to reduce the number of spheres in U87 cell line, as well as the amount of CD133+ cells. We believe that the purinergic system is involved in the formation of cancer stem cells, and ATP is playing a role in the formation of spheres.

Acknowledgements

The present research was supported by grants from Brazilian funding agencies FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). P.L. was recipient of CNPq fellowship.

References

- Al-Hajj, M., Becker, M.W., Wicha, M., Weissman, I. and Clarke, M.F. (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 43-47.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D. and Rich, J.N. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, **444**, 756-760.
- Burnstock, G. (2008) Unresolved issues and controversies in purinergic signalling. *J Physiol*, **586**, 3307-3312.
- Demuth, T. and Berens, M.E. (2004) Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol*, **70**, 217-228.
- Diamandis, P., Wildenhain, J., Clarke, I.D., Sacher, A.G., Graham, J., Bellows, D.S., Ling, E.K., Ward, R.J., Jamieson, L.G., Tyers, M. and Dirks, P.B. (2007)

- Chemical genetics reveals a complex functional ground state of neural stem cells. *Nat Chem Biol*, **3**, 268-273.
- Hoelzinger, D.B., Demuth, T. and Berens, M.E. (2007) Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J Natl Cancer Inst*, **99**, 1583-1593.
- Morrone, F.B., Horn, A.P., Stella, J., Spiller, F., Sarkis, J.J., Salbego, C.G., Lenz, G. and Battastini, A.M. (2005) Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurooncol*, **71**, 135-140.
- Morrone, F.B., Jacques-Silva, M.C., Horn, A.P., Bernardi, A., Schwartzmann, G., Rodnight, R. and Lenz, G. (2003) Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurooncol*, **64**, 211-218.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- Resende, R.R., Majumder, P., Gomes, K.N., Britto, L.R. and Ulrich, H. (2007) P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor expression and modulation of N-methyl-D-aspartate-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. *Neuroscience*, **146**, 1169-1181.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J. and Dirks, P.B. (2003) Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res*, **63**, 5821-5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. and Dirks, P.B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, **432**, 396-401.
- Stiles, C.D. and Rowitch, D.H. (2008) Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron*, **58**, 832-846.
- Wink, M.R., Lenz, G., Braganhol, E., Tamajusuku, A.S., Schwartzmann, G., Sarkis, J.J. and Battastini, A.M. (2003) Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett*, **198**, 211-218.
- Yu, S.-c., Ping, Y.-f., Yi, L., Zhou, Z.-h., Chen, J.-h., Yao, X.-h., Gao, L., Wang, J.M. and Bian, X.-w. (2008) Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett*
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L. and Yu, J.S. (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, **23**, 9392-9400.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Soro e Células Tronco Tumorais

Tumoresferas são definidas como colônias não-aderentes derivadas de uma única célula tronco tumoral. Em trabalho de Singh e colaboradores, em 2003, tumoresferas primárias e secundárias apresentaram expressão de nestina e de CD133, marcadores de células indiferenciadas, e quando tiveram sua diferenciação induzida pela presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo, passaram a expressar os marcadores de células neurais diferenciadas GFAP (para astrócitos) e β -tubulina 3 (para neurônios) (SINGH *et al.*, 2003). Culturas de tumor de cérebro podem ser enriquecidas em células tumorais com características de células tronco por meio de cultivo livre de soro ou por *cell sorting* usando o marcador de superfície CD133. As condições para a cultura de células tronco tumorais em cérebro foram adaptadas de culturas de células tronco neuronais normais (como neuroesferas). Em culturas livres de soro e enriquecidas com fatores de crescimento epidermal e de fibroblasto (EGF e FGF, respectivamente), as células de tumor de cérebro humano formam colônias que expressam marcadores de células indiferenciadas, como nestina e CD133. Neuroesferas e tumoresferas são heterogêneas, e também apresentam células expressando marcadores de células diferenciadas. No entanto, a ausência de soro no cultivo de glioblastomas tem permitido uma melhor retenção genotípica do tumor primário do paciente, mantendo as propriedades tronco estáveis *in vitro* (DIRKS, 2008). Na maioria de nossos experimentos, as células foram cultivadas em SFB. O cultivo, entretanto, foi realizado com 5% de soro, sendo que a concentração normalmente utilizada para o cultivo de U87 é 10%. Mesmo em 10% de soro, U87 forma esferas em nossas mãos. A redução da quantidade de soro utilizada eleva a formação de esferas. Menos de 5% de SFB, sem adição de fatores de crescimento, impossibilitou nossas culturas. Observamos que, mesmo com 5% de SFB, as células nas esferas expressaram os marcadores de células indiferenciadas OCT-4 e CD133. Tais marcadores não foram observados em culturas de monocamada da mesma linhagem celular, indicando que o microambiente formado em torno das esferas é suficiente para manutenção de células que expressam marcadores tronco, apesar da presença de concentrações reduzidas de SFB. Lee e colaboradores, em 2006, cultivou células de gliomas de pacientes em *soft agar* com e sem soro (com fatores de crescimento). Células em diferentes passagens, quando cultivadas

constantemente em fatores de crescimento, prontamente formavam colônias em *agar*. Células cultivadas em fatores e então passadas para *soft agar* em SFB não formavam colônias. Células com poucas passagens cultivadas em SFB, quando passadas para *soft agar* em qualquer condição (com ou sem SFB), não formaram colônias. Porém, células cultivadas em SFB com muitas passagens, apresentando crescimento exponencial, formaram grandes colônias em *soft agar* com SFB, mas não com fatores. Este último caso parece ser o observado em nosso trabalho, com U87. As células cultivadas com fatores de crescimento ou as células cultivadas em SFB com muitas passagens mostraram maior potencial tumorigênico do que as células cultivadas em SFB com poucas passagens. Análise do transcriptoma de células cultivadas em soro e em fatores mostrou diferenças importantes; diferenças fenotípicas também foram observadas como consequência da presença ou ausência de SFB. Genes associados a células tronco foram observados, ainda neste mesmo trabalho, somente em células cultivadas com fatores (LEE *et al.*, 2006). Nossos resultados, no entanto, demonstram que U87 não apenas forma esferas quando cultivada em soro, como estas esferas apresentam genes marcadores de células tronco apesar da presença de SFB no meio de cultivo.

Características das células aderidas e das esferas

A presença de CD133 em maior proporção nas esferas do que em monocamada, resultado observado por meio de Western Blotting e citometria de fluxo, sugere que de fato a nossa linhagem contém uma população de células-tronco tumorais, e estas estão enriquecidas nas esferas, conforme já demonstrado em outros trabalhos. Hamer e colaboradores, em 2007, analisaram mudanças genéticas de células em cultura em comparação com o tumor parental. Com o tempo, as características genéticas das culturas primárias afastam-se cada vez mais do perfil genético do tumor original. Quando as células do tumor são cultivadas como esferas, esta diferenciação é menor. Esferas são, portanto, mais estáveis, enquanto que culturas primárias sofrem mudanças progressivas ao longo do tempo de cultivo. É importante ressaltar que neste estudo as culturas foram realizadas com o uso de soro, e que mesmo após culturas de várias semanas as esferas permaneceram apresentando marcação positiva para CD133.

Diferenciação Celular e o Sistema Purinérgico

O potencial de diferenciação de tumoresferas não é o mesmo de neuroesferas, mas, tipicamente, tumores malignos de cérebro possuem a capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens. Entretanto, NSCs e CSCs têm em comum várias características, como auto-renovação, possibilidade de diferenciação em vários tipos celulares e expressão de marcadores típicos de células indiferenciadas neurais. Resende e colaboradores, em 2007, analisaram a expressão de diversos receptores purinérgicos ao longo do processo de diferenciação celular na linhagem P19, que é derivada de carcinoma embrionário. Por ser um dos poucos trabalhos na literatura descrevendo a expressão destes receptores em processos de diferenciação, o utilizamos para comparar com nossos resultados. Encontramos, por exemplo, a expressão de P2X₄ em esferas, que, por conterem a população de células tronco tumorais, poderiam ser consideradas como “menos diferenciadas” do que as células de monocamada. Em P19, a expressão deste receptor sofre redução ao longo do processo de diferenciação. P2Y₁ também aparenta estar mais presente em esferas, corroborando resultados observados na linhagem de carcinoma embrionário, apesar de PCR em tempo real ser necessário para confirmar este dado. A expressão do receptor P2X₆ foi observada apenas em monocamada. O aumento da expressão deste foi observado em células diferenciadas (RESENDE *et al.*, 2007). Wang e colaboradores sugeriram, em 2004, que o conhecimento da expressão de receptores do tipo P2 em processos de diferenciação poderia ser utilizado para direcionar, por meio de agonistas e/ou antagonistas, a diferenciação ou a proliferação das células tronco. Neste trabalho a expressão de P2Y₁ e P2Y₂ foi observada em células tronco CD34+ e células progenitoras, bem como a expressão de P2X₁, P2X₄ e P2X₇. Não observamos a expressão de P2X₁, P2X₂ e P2Y₂ em U87 em nenhuma condição de cultivo. Fora isso, os resultados também estão de acordo com os nossos, exceto pela expressão de P2X₇, que é mais forte em monocamada do que em esferas (Tabela 1).

Tabela 1. Receptores Purinérgicos em astrócitos, gliomas e células indiferenciadas

Receptor	Expressão em astrócitos	Expressão em gliomas	Expressão ao longo do processo de diferenciação	Expressão em Monocamada (U87)	Expressão em Esferas (U87)
P1	-----	-----	-----	-----	-----
A1	+ ⁹	+ ³			
A2a	+ ⁹	+ ³			
A2b	+ ⁹	+ ³		++	+
A3	+ ⁹	+ ³			
P2X	-----	-----	-----	-----	-----
1	+ ^{9; 10}		↓ ⁶		
2	+ ^{9; 10}	+ ¹²	↑ ²		
3	+ ^{9; 10}		↓ ²		
4	+ ^{9; 10}	+ ¹²	↓ ^{2; 6}	+	++
5	+ ¹⁰	+ ¹²			
6	+ ⁹		↑ ²	+	-
7	+ ^{8; 9; 10}	+ ¹¹	↓ ⁶	+	-
P2Y	-----	-----	-----	-----	-----
1	+ ^{9; 10}	+ ^{1; 12}	↓ ^{2; 6}	+	+
2	+ ^{9; 10}	+ ^{7; 3; 12}	↑ ²		
4	+ ^{9; 10}	+ ^{3; 5; 12}	↓ ²		
6	+ ¹⁰		↑ ²		
11		+ ⁵			
12	+ ¹⁰	+ ^{1; 7; 12}		-	+
13		+ ¹²		-	+
14	+ ⁴	+ ^{4; 12}		+	++

Fonte: 1.(CZAJKOWSKI et al., 2002); 2.(RESENDE et al., 2007); 3.(MORRONE et al., 2003); 4.(KRZEMINSKI et al., 2008);5. (MORRONE et al., 2003); 6.(WANG et al., 2004); 7.(KRZEMINSKI et al., 2007); 8.(WANG et

al., 2003); 9.*(KUCHER et al., 2005)*; 10.*(FUMAGALLI et al., 2003)*; 11.*(WEI et al., 2008)*; 12.*(BRAGANHOL et al., 2009)*

Considerando-se o papel do sistema purinérgico em processos de proliferação e de diferenciação, e a expressão dos receptores que possuem ATP como agonista, resolvemos testar o efeito deste nucleotídeo sobre as esferas. A adição de ATP ao meio de cultura em baixas concentrações é capaz de reduzir a formação de esferas na linhagem U87. A redução de 54% no número de esferas formadas no tratamento com ATP pode indicar redução do nível de agressividade do tumor, sendo que o número de células necessário para formar uma tumoresfera vai de 1014 no controle para 1270 no tratamento com ATP. A redução do percentual de células CD133+ no tratamento com ATP, conforme visto por meio de citometria de fluxo, confirma esta hipótese. Receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ funcionais já foram reportados em gliomas, em astrocitomas e também em diferentes linhagens celulares. Estes receptores têm sido ligados a uma variedade de sistemas de mensageiros secundários diferentes, incluindo proteínas G inibitórias e enzimas da via de ativação de caspases. A ativação do receptor P2Y₁₂ parece estar envolvida com o aumento da proliferação celular, enquanto que a ativação de P2Y₁ tem efeitos contraditórios em diferentes linhagens, provocando aumento ou decréscimo do número de células (WHITE E BURNSTOCK, 2006; KRZEMINSKI et al., 2007). Encontramos a expressão de P2Y₁₂ em esferas, mas não em monocamada. Considerando que a presença de células tronco tumorais parece ser relacionada à malignidade do tumor, nossos resultados condizem com a presença deste receptor em gliomas.

Depleção de ATP no modelo de crescimento de gliomas C6 em ratos é absolutamente dependente da molécula produzida pela degradação de ATP, pois a injeção de NTPDase1, que degrada ATP para produzir AMP, reduziu o crescimento tumoral (MORRONE *et al.*, 2006) enquanto que transfecção dos gliomas com NTPDase2, que degrada ATP para produzir predominantemente ADP, aumentou significativamente o tamanho tumoral. Não observamos um efeito significativo para ADP ou UTP, mas a adenosina parece ser um estimulador do crescimento de tumoresferas de U87. Estudos em C6 se fazem necessários para verificar se os efeitos observados na U87 são repetidos na linhagem murina, o que possibilitaria uma

interpretação mais aproximada da importância do efeito do ATP sobre o crescimento de CSCs na biologia tumoral.

Terapia Diferenciativa

Em 2007, Diamandis e colaboradores realizaram uma triagem química e genética para substâncias que inibissem a proliferação de neuroesferas. Os compostos testados também apresentaram efeitos sobre células tronco tumorais de cérebro. 1267 compostos com atividade farmacológica foram testados na inibição da proliferação de neuroesferas por meio de MTT. Os compostos atuaram reduzindo o número, o tamanho e as propriedades de adesão célula-célula e célula-superfície das esferas. Dois compostos com atividade inibitória, Azatioprina e 2-Metiloadenosina difosfato trisódio, podem atuar por meio de receptores do tipo P2. Terapias que afetem a diferenciação podem atuar na malignidade dos tumores, e devem, portanto, ser exploradas. Entre os compostos mais ativos foram encontrados agonistas e antagonistas de receptores dopaminérgicos. Como pacientes com doença de Parkinson são usuários crônicos de agonistas dopaminérgicos, é sugestivo que estes possuam menor incidência de câncer de cérebro quando comparados com a população em geral. As drogas utilizadas no tratamento de Parkinson atuam em células precursoras neurais e reduzem a formação de esferas. Esse dado demonstra a importância de terapias diferenciativas, sendo que agentes já em uso terapêutico podem ser re-testados com este enfoque, e estes compostos podem passar a ser imediatamente utilizados (DIAMANDIS *et al.*, 2007). O ATP poderia ser um candidato, mas para tanto o papel do sistema purinérgico na manutenção e proliferação de células tronco tumorais deve ser levado em consideração, e investigações mais aprofundadas a respeito do efeito do ATP sobre as células tronco tumorais são necessárias. Estudos *in vivo* também devem ser explorados.

PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios de formação de esferas com e sem ATP utilizando meio com fatores de crescimento ao invés de SFB.
- Realizar citometria de fluxo em células tratadas ou não com ATP e outros agonistas do sistema purinérgico, principalmente adenosina.
- Reavaliar as aparentes diferenças de expressão entre os genes de receptores purinérgicos e marcadores de diferenciação em esferas e monocamada por meio de PCR em tempo real.
- Realizar culturas primárias com tumores de pacientes, cultivando as células em meio com fatores de crescimento ao invés de SFB, e avaliar a presença de células tronco tumorais.
- Avaliar o efeito do ATP sobre a população de células tronco tumorais, se presentes, em culturas primárias de tumores de pacientes.
- Avaliar o efeito de outros nucleotídeos e nucleosídeos na formação de esferas, tanto em linhagens celulares de glioma quanto em culturas primárias de tumores de pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HAJJ, M., BECKER, M.W., WICHA, M., WEISSMAN, I. and CLARKE, M.F. Therapeutic implications of cancer stem cells. **Curr Opin Genet Dev**, v. 14, p. 43-47, 2004.
- BAO, S., WU, Q., MCLENDON, R.E., HAO, Y., SHI, Q., HJELMELAND, A.B., DEWHIRST, M.W., BIGNER, D.D. & RICH, J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, p. 756-760, 2006.
- BRAGANHOL, E., HUPPES, D., BERNARDI, A., WINK, M.R., LENZ, G. & BATTASTINI, A.M. A comparative study of ectonucleotidase and P2 receptor mRNA profiles in C6 cell line cultures and C6 ex vivo glioma model. **Cell Tissue Res**, v. 335, p. 331-340, 2009.
- BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacol Rev**, v. 58, p. 58-86, 2006.
- BURNSTOCK, G. Unresolved issues and controversies in purinergic signalling. **J Physiol**, v. 586, p. 3307-3312, 2008.
- CZAJKOWSKI, R., LEI, L., SABALA, P. & BARANSKA, J. ADP-evoked phospholipase C stimulation and adenylyl cyclase inhibition in glioma C6 cells occur through two distinct nucleotide receptors, P2Y₁ and P2Y₁₂. **FEBS Lett**, v. 0014-5793, 2002.
- DEMUTH, T. & BERENS, M.E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **J Neurooncol**, v. 70, p. 217-228, 2004.
- DIAMANDIS, P., WILDENHAIN, J., CLARKE, I.D., SACHER, A.G., GRAHAM, J., BELLOWS, D.S., LING, E.K., WARD, R.J., JAMIESON, L.G., TYERS, M. & DIRKS, P.B. Chemical genetics reveals a complex functional ground state of neural stem cells. **Nat Chem Biol**, v. 3, p. 268-273, 2007.
- DIRKS, P.B. Brain Tumor Stem Cells: Bringing Order to the Chaos of Brain Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 2916-2924, 2008.
- FARGEAS, C.A., JOESTER, A., MISSOL-KOLKA, E., HELLWIG, A., HUTTNER, W.B. & CORBEIL, D. Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis. **J Cell Sci**, v. 117, p. 4301-4311, 2004.
- FOMCHENKO, E.I. & HOLLAND, E.C. Stem cells and brain cancer. **Exp Cell Res**, v. 306, p. 323-329, 2005.
- FUMAGALLI, M., BRAMBILLA, R., D'AMBROSI, N., VOLONTE, C., MATTEOLI, M., VERDERIO, C. & ABBRACHIO, M.P. Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. **Glia**, v. 43, p. 218-203, 2003.
- HAMER, P.D.W., VAN TILBORG, A., EIJK, P., SMINIA, P., TROOSTt, D., VAN NOORDEN, C., YLSTRA, B. & LEENSTRA, S. The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. **Oncogene**, v. 0950, p. 1-6, 2007.
- HOELZINGER, D.B., DEMUTH, T. & BERENS, M.E. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. **J Natl Cancer Inst**, v. 99, p. 1583-1593, 2007.

- HOLLAND, E.C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nat Rev Genet**, v. 2, p. 120-129, 2001.
- JACQUES-SILVA, M.C., BERNARDI, A., RODNIGHT, R. & LENZ, G. ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line. **Oncology**, v. 67, p. 450-459, 2004a.
- JACQUES-SILVA, M.C., RODNIGHT, R., LENZ, G., LIAO, Z., KONG, Q., TRAN, M., KANG, Y., GONZALEZ, F.A., WEISMAN, G.A. & NEARY, J.T. P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. **Br J Pharmacol**, v. 141, p. 1106-1117, 2004b.
- KRZEMINSKI, P., SUPLAT, D., CZAJKOWSKI, R., POMORSKI, P. & BARANSKA, J. Expression and functional characterization of P2Y1 and P2Y12 nucleotide receptors in long-term serum-deprived glioma C6 cells. **Febs J**, v. 274, p. 1970-1982, 2007.
- KUCHER, B.M. & NEARY, J.T. Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes. **J Neurochem**, v. 92, p. 525-535, 2005.
- LEE, J., KOTLIAROVA, S., KOTLIAROV, Y., LI, A., SU, Q., DONIN, N.M., PASTORINO, S., PUROW, B.W., CHRISTOPHER, N., ZHANG, W., PARK, J.K. & FINE, H.A. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. **Cancer Cell**, v. 9, p. 391-403, 2006.
- LENZ, G., GOTTFRIED, C., LUO, Z., AVRUCH, J., RODNIGHT, R., NIE, W.J., KANG, Y. & NEARY, J.T. P(2Y) purinoceptor subtypes recruit different mek activators in astrocytes. **Br J Pharmacol**, v. 129, p. 927-936, 2000.
- LOUIS, D.N. Molecular pathology of malignant gliomas. **Annu Rev Pathol**, v. 1, p. 97-117, 2006.
- LOUIS, D.N.O., H.; WIESTLER, O.D.; CAVENEE, W.K.; BURGUER, P.C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B.W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathol**, p. 97-109, 2007.
- MORRONE, F.B., HORN, A.P., STELLA, J., SPILLER, F., SARKIS, J.J., SALBEGO, C.G., LENZ, G. & BATTASTINI, A.M. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. **J Neurooncol**, v. 71, p. 135-140, 2005.
- MORRONE, F.B., JACQUES-SILVA, M.C., HORN, A.P., BERNARDI, A., SCHWARTSMANN, G., RODNIGHT, R. & LENZ, G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. **J Neurooncol**, v. 64, p. 211-218, 2003.
- MORRONE, F.B., OLIVEIRA, D.L., GAMERMANN, P., STELLA, J., WOFCHUK, S., WINK, M.R., MEURER, L., EDELWEISS, M.I., LENZ, G. & BATTASTINI, A.M. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. **BMC Cancer**, v. 6, p. 226, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- OHGAKI, H. & KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol**, v. 170, p. 1445-1453, 2007.
- RESENDE, R.R., MAJUMDER, P., GOMES, K.N., BRITTO, L.R. & ULRICH, H. P19 embryonal carcinoma cells as in vitro model for studying purinergic receptor

- expression and modulation of N-methyl-D-aspartate-glutamate and acetylcholine receptors during neuronal differentiation. **Neuroscience**, v. 146, p. 1169-1181, 2007.
- SANSON, M., THILLET, J. & HOANG-XUAN, K. Molecular changes in gliomas. **Curr Opin Oncol**, v. 16, p. 607-613, 2004.
- SINGH, S.K., CLARKE, I.D., HIDE, T. & DIRKS, P.B. Cancer stem cells in nervous system tumors. **Oncogene**, v. 23, p. 7267-7273, 2004a.
- SINGH, S.K., CLARKE, I.D., TERASAKI, M., BONN, V.E., HAWKINS, C., SQUIRE, J. & DIRKS, P.B. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. **Cancer Res**, v. 63, p. 5821-5828, 2003.
- SINGH, S.K., HAWKINS, C., CLARKE, I.D., SQUIRE, J.A., BAYANI, J., HIDE, T., HENKELMAN, R.M., CUSIMANO, M.D. & DIRKS, P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, p. 396-401, 2004b.
- STILES, C.D. & ROWITCH, D.H. Glioma stem cells: a midterm exam. **Neuron**, v. 58, p. 832-846, 2008.
- UCHIDA, N., BUCK, D.W., HE, D., REITSMA, M.J., MASEK, M., PHAN, T.V., TSUKAMOTO, A.S., GAGE, F.H. & WEISSMAN, I.L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, p. 14720-14725, 2000.
- WANG, C.M., CHANG, Y.Y. & SUN, S.H. Activation of P2X7 purinoceptor-stimulated TGF-beta 1 mRNA expression involves PKC/MAPK signalling pathway in a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2. **Cell Signal**, v. 15, p. 1129-1137, 2003.
- WANG, L., JACOBSEN, S.E., BENGTSSON, A. & ERLINGE, D. P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. **BMC Immunol**, v. 5, p. 16, 2004.
- WEI, W., RYU, J.K., CHOI, H.B. & MCLARNON, J.G. Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells. **Cancer Lett**, v. 260, p. 79-87, 2008.
- WHITE, N. & BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, p. 211-217, 2006.
- WINK, M.R., LENZ, G., BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A.S., SCHWARTSMANN, G., SARKIS, J.J. & BATTASTINI, A.M. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. **Cancer Lett**, v. 198, p. 211-218, 2003.
- YU, S.-C., PING, Y.-F., YI, L., ZHOU, Z.-H., CHEN, J.-H., YAO, X.-H., GAO, L., WANG, J.M. & BIAN, X.-W. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. **Cancer Lett**, v. 265, p. 124-134, 2008.
- YUAN, X., CURTIN, J., XIONG, Y., LIU, G., WASCHSMANN-HOGIU, S., FARKAS, D.L., BLACK, K.L. & YU, J.S. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. **Oncogene**, v. 23, p. 9392-9400, 2004.

ANEXO 1

Cultura primária de tumores de pacientes

Cultura primária de tumores de pacientes

Foram recebidos dois tumores de pacientes em colaboração com grupo de pesquisas da PUC-RS durante os meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008. Foi implementada a técnica de cultura primária em nosso laboratório, e a metodologia utilizada e os resultados obtidos estão descritos a seguir.

A explicação aos pacientes, a assinatura do consentimento informado e a coleta das amostras foram realizados pela Doutoranda Adriana Franciose Ritter dos Santos sob orientação do Dr. Bernardo Garicochea da PUC-RS. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC-RS (Protocolo nº 07/03562).

Protocolo para cultura primária de tumor humano

- Meio de coleta de biópsia

10 mL de penicilina (5000 U/mL) e streptomicina (5 mg/mL)

5 mL de kanamicina (2,5 mg/mL)

5 mL de anfotericina B (fungizona) (62,5 µg/mL)

500 mL de meio Ham's F10 tamponado com 20 mM de hepes (sem sódio), pH 7,4

- Para o meio de coleta final, adicionar 2 mL do mix de antibióticos aos 500 mL de meio Ham's. Separar em alíquotas de 15 mL. Estável por 2 meses a 4 °C.

- Meio de cultivo

DMEM F12 com 10% de soro fetal bovino (ou fatores de crescimento) ou Ham's F10 com 20 mM de hepes e 10% de soro fetal bovino.

- Colagenase

A colagenase tipo A deve ser dissolvida em HBSS (2000 U/mL), filtrada e aliquoteada em eppendorfs de 1,5 mL. Congelar a -20 °C.

- Polilisina

Preparar uma solução 1000 vezes concentrada e guardar no freezer. Fazer uma diluição para 100X, que também deve ser guardada no freezer. A concentração de uso da polilisina é 1X. Filtrar a polilisina e colocar quantidade suficiente para cobrir a superfície da garrafa. Esperar 40-60 minutos, deixando a garrafa na estufa ou no fluxo. Retirar a polilisina e enxaguar a garrafa com água estéril.

Este processo pode ser feito um dia antes da cultura ou um pouco antes da mesma. A polilisina contém cargas positivas que ajudam na adesão das células na placa pela carga negativa das membranas.

- Dissociação da biópsia

O tumor foi transferido para uma placa de Petri junto com o meio de coleta final. Foram cortados pedaços de aproximadamente 1 mm por 1 mm usando bisturi. Os pedaços foram removidos para um tubo com mais 15 mL de meio de coleta, e esperou-se que sedimentassem. O sobrenadante foi removido e o processo foi repetido mais duas vezes. As peças foram ressuspensas em meio de cultivo. O tecido foi incubado com colagenase (1,5 mL de colagenase em 15 mL de meio de cultivo) por 4 horas a 37 °C. A preparação foi pipetada até a desagregação total. Centrifugou-se por 5 min. a 250 g e descartou-se a solução enzimática. As células foram ressuspensas em meio de crescimento, transferidas para uma garrafa de 25 cm² e incubadas a 37 °C *overnight*.

Relatório de cultivo de tumor de paciente – (cirurgia: 29/11/2007)

Responsáveis:

UFRGS: Pítia Flores Ledur; Dr. Guido Lenz

PUC-RS: Adriana Ritter; Dr. Bernardo Garicochea

Paciente: Feminino

Terceira cirurgia

Histopatologia: Astrocitoma grau III

Dissociação Mecânica: dia 1 - (29/11/2007) – 2 horas depois da retirada do tumor.

1. O tumor foi retirado do paciente e colocado em tubos do tipo falcon de 15 mL com meio de coleta final (ver protocolos acima).
2. O tecido foi limpo macroscopicamente para retirada de vasos com o auxílio de pinça.

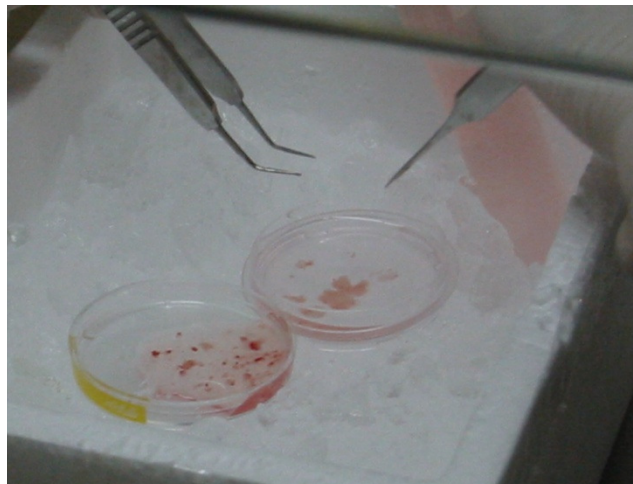


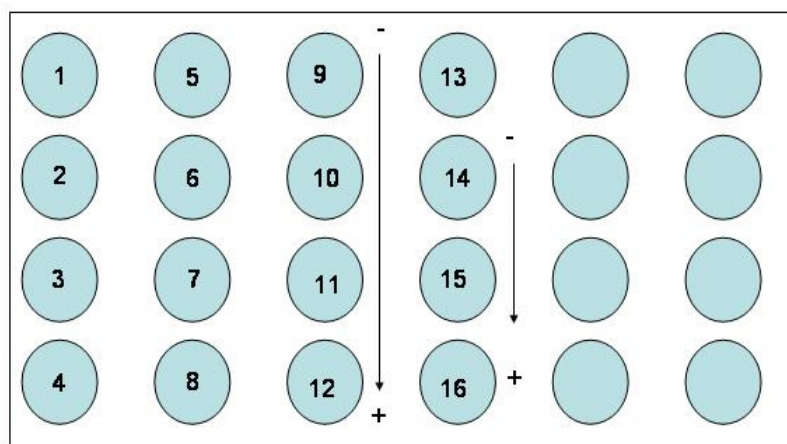
Figura 3 – limpeza macroscópica do tecido da biópsia

3. O tecido foi cortado com tesoura de dissecação.

4. Os pedaços foram homogeneizados com pipeta graduada, e a seguir com pipeta Pasteur com pontas flambadas (primeiramente com uma Pasteur com ponta grossa e a seguir com uma Pasteur com ponta mais fina).
5. Esperou-se a sedimentação dos pedaços maiores em um tubo do tipo falcon de 15 mL, e retirou-se o sobrenadante para um novo tubo.
6. Centrifugou-se por 5 minutos, 1000 RPM. O pellet superficial (rosado) foi removido, e o restante foi ressuspendido.
7. O n° de células foi estimado em câmara de Neubauer (aproximadamente 10 milhões de células).
8. Metade das células foram plaqueadas em garrafa tratada com polilisina com meio de cultivo (protocolo acima) e a outra metade em garrafa não tratada.

Dia 2 – 30/11/2007

A garrafa com polilisina apresentava células aderidas, mas a garrafa não tratada aparentemente não apresentava células aderidas, mas uma grande quantidade de grumos de células (esferas?). O meio da garrafa não tratada com polilisina, no qual haviam células em suspensão, foi plaqueado em placa de 24 poços (tratada com polilisina), da seguinte forma:



5-8 (coverslips): 5 e 7 – poucas células. 6 e 8 muitas células.

2, 3, 9-12, 14, 15: esferas dissociadas com tripsina, gradiente de concentração de células conforme figura. Poços 2 e 3 com quantidades aleatórias.

Figura 4 – esquema demonstrando o plaqueamento das células de tumor de paciente.

Nos poços 5-8, os grumos de células/esferas foram colocados em aproximadamente 10 ul de meio no fundo do poço e uma lamínula (*coverslip*) foi adicionada sobre estas células. Em seguida foi colocado meio de cultura para preencher o poço. Os poços 5 e 7 receberam poucas esferas (~10) enquanto que poços 6 e 8 receberam muitas esferas.

Dissociação Enzimática: colagenase – (30/11/2007)

1. Os passos 1-3 da dissociação mecânica foram repetidos
2. Os pedaços foram incubados com colagenase (ver protocolo) por 3 horas
3. As células tratadas com colagenase foram passadas por pipetas Pasteur como no ítem 4 da dissociação mecânica
4. Um terço das células foram conservadas em trizol para extração de mRNA.
5. Metade das células restantes foram plaqueadas em uma garrafa com polilisina e a outra metade em uma garrafa sem polilisina.

Dia 1

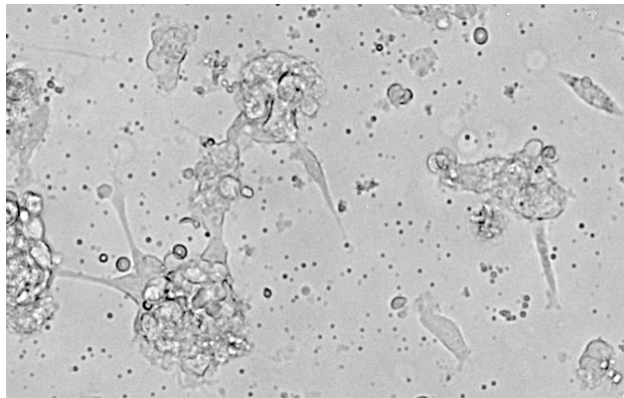


Figura 5 - Placa com polilisina: algumas células já aderidas e uma grande quantidade de grumos.

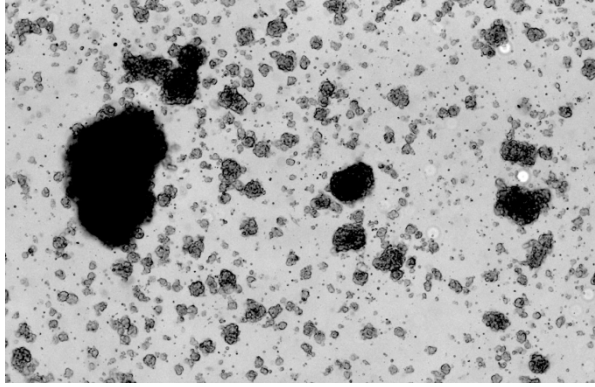


Figura 6 - Placa sem polilisina. Praticamente nenhuma célula aderida, mas muitas células em suspensão, que depois constatamos serem viáveis.

Dia 2

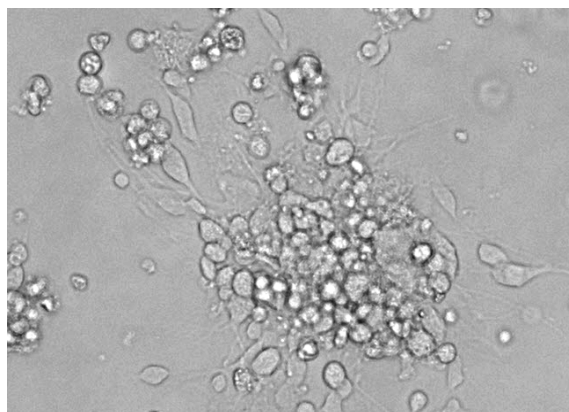


Figura 7 - Células em garrafa com polilissina.

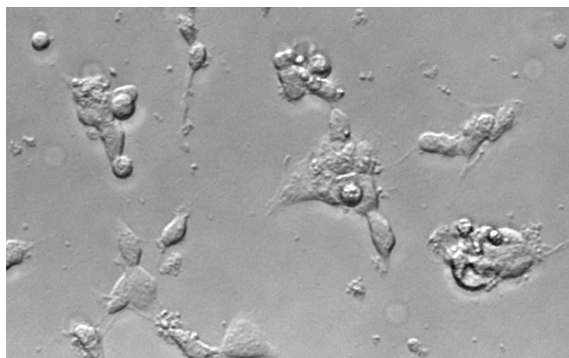


Figura 8 - Células que aderiram ao plástico mesmo em garrafa não tratada com polilissina.

Dia 4

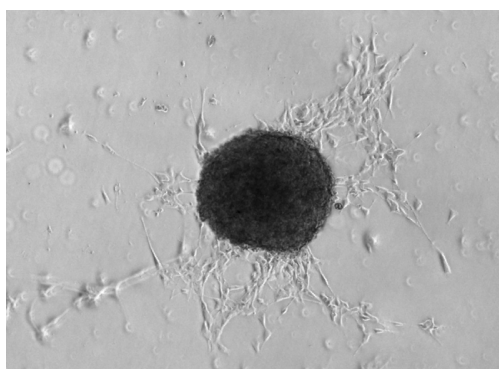


Figura 9 - Esfera do poço 5 da placa de 24 poços, da qual saíram células viáveis que se aderiram à placa

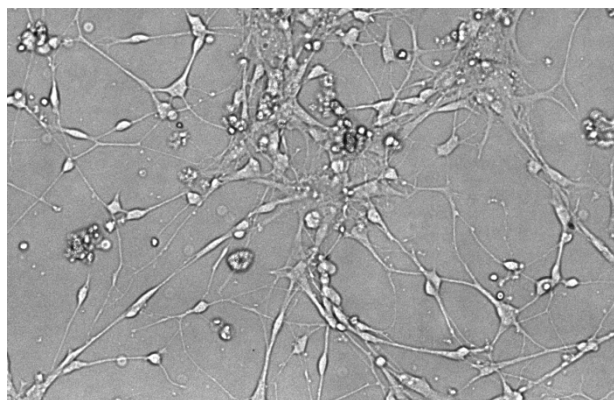


Figura 10 - Poço 3c: células com muitos processos, várias com aspectos de neurônios, mas que não parecem muito preocupantes, pois neurônios não permanecem em cultura por muito tempo.

Relatório de cultivo de tumor de paciente – (cirurgia: 13/12/2007)

Responsáveis:

UFRGS: Pítia Flores Ledur; Dr. Guido Lenz

PUC-RS: Adriana Ritter; Dr. Bernardo Garicochea

Paciente: Masculino - 60 anos

Histopatologia: glioblastoma - lóbulo temporal – primeira cirurgia

Médico neurocirurgião responsável: Dr. Ney Asambuja

Dissociação Mecânica: dia 1 - (13/12/2007) – 2 horas depois da retirada do tumor.

1. O tumor foi retirado do paciente e colocado em dois tubos (tipo falcon) de 15 mL com meio de coleta final (ver protocolo).
2. Em um dos tubos veio o tecido abaixo, bastante irrigado e que os cirurgiões afirmaram ser tumor.

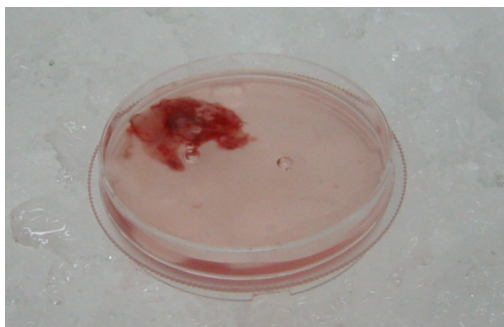


Figura 11 – pedaço de tecido tumoral com vasos

3. O tecido foi limpo macroscopicamente para retirada de vasos com o auxílio de pinça – metade deste tecido foi guardada para dissociação enzimática e a outra metade foi utilizada para a dissociação mecânica abaixo.
4. O tecido foi cortado com tesoura de dissecação
5. Os pedaços foram homogeneizados com pipeta graduada (+ ou – 10 vezes), e a seguir com pipeta Pasteur com pontas flambadas (+ ou – 10 vezes com uma Pasteur com ponta grossa e 10x com uma pipeta *Pasteur* com ponta fina).
6. Os pedaços maiores foram sedimentados (falcon de 15 mL) e retirou-se o sobrenadante para um novo falcon
7. Centrifugou-se por 5 minutos, 1000 RPM. O pellet superficial (rosado) foi removido, e o restante foi ressuspensionado
8. Metade das células foram plaqueadas em garrafa tratada com polilisina com meio de cultivo (protocolo acima) e a outra metade em garrafa não tratada.

Um pedaço deste tumor foi guardado em paraformaldeído para futura análise histológica.

Dia 2 – 14/12/2007

Tanto a garrafa com polilisina como a sem polilisina apresentava células aderidas. As duas garrafas apresentavam uma grande quantidade de esferas.

Um dos tubos veio com dois pedaços grandes de tecido (abaixo) contendo uma quantidade considerável de tecido com aparência normal.



Figura 12 – pedaços de tecido tumoral antes da dissociação.

Deste tecido foram isoladas quatro populações baseadas em aparência do tecido.

Estes tecidos foram dissociados mecanicamente e metade foi lisado em trizol e a outra metade foi congelada para ser usada em experimentos de WB.

1 - Tecido normal – foi retirada a substância branca e a substância cinzenta foi cortada em pedaços para a dissociação mecânica do tecido. Após sedimentação por 2 min., o sobrenadante foi plaqueado em polilisina (separado em uma fração com células vermelhas e outra sem). O restante (aproximadamente 90%) foi dividido nas duas frações como explicado acima

2 - Tecido adjacente ao normal

3 - Tecido adjacente ao tumoral

4 - Tecido tumoral

Dissociação Enzimática: collagenase – 14/12/2007

1. Pedacos limpos do passo 3 acima foram incubados com collagenase (ver protocolo) por 4 horas.

2. As células tratadas com colagenase foram passadas por pipetas *Pasteur* como no ítem nº. 4 acima.
3. Metade das células restantes foram plaqueadas em uma garrafa com polilisina e a outra metade em uma garrafa sem polilisina.

Estas culturas primárias foram utilizadas em um artigo submetido de nosso laboratório, em anexo a seguir.

ANEXO 2

Characterization of ATP-induced cell death in GL261 mouse glioma cell line

CHARACTERIZATION OF ATP-INDUCED CELL DEATH IN GL261 MOUSE GLIOMA CELL LINE.

Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku¹, Romela Paulus¹, Emilly Villodre¹, Pítia Flores Ledur¹, Adriana Franciosi Ritter dos Santos⁴, Bernardo Garicochea⁴, Robson Coutinho-Silva⁵, Ana Maria Oliveira Battastini², Márcia Rosângela Wink³, Guido Lenz^{1*}

¹ UFRGS, Department of Biophysics, Porto Alegre, RS, Brazil

² UFRGS, Department of Biochemistry, Rua Ramiro Barcelos, 2600-anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

³ UFCSPA, Department of Biochemistry, Rua Sarmiento Leite, 245 Sala 304, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ PUC-RS, Faculty of Medicine, Department of Oncology, Av. Ipiranga 6690, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil and

⁵ UFRJ, Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Bloco G- Lab. Imunofisiologia, Cidade Universitária, CEP 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

* Corresponding author: Dr. G. Lenz

Departamento de Biofísica – IB – UFRGS

Rua Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43431 – Lab. 107

CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, BRASIL

TEL: +55 51 3308 7620 FAX +55 51 3308 7309

e-mail: lenz@ufrgs.br

CURRICULUM VITAE

Pítia Flores Ledur

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/7333113207286109>

Nome Pítia Flores Ledur

**Nome em citações
bibliográficas** LEDUR, P. F.

Sexo Feminino

**Endereço
profissional** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências.
Avenida Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, Laboratório 107
Partenon
91501-970 - Porto Alegre, RS - Brasil - Caixa-Postal: 15053
Telefone: (51) 33087620 Ramal: 7620
URL da Homepage: www.ufrgs.br/labsinal

Formação acadêmica/Titulação

2007-2009 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Título: Células tronco tumorais e o Sistema Purinérgico, *Orientador:* Guido Lenz.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2003 - 2006 Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
UFRGS, Brasil.
Título: Expressão de genes envolvidos na regulação da apoptose em gliomas.
Orientador: Guido Lenz.
Bolsista do(a): UFRGS.

Formação complementar

2006 - 2006 Extensão universitária em SIMPÓSIO PESQUISA PRÉ-CLÍNICA E CLÍNICA EM
TERAPIA. (Carga horária: 30h).
UFRGS.

2006 - 2006 1º ciclo de palestras em imunologia básica e aplicada
UFRGS.

- 2006 - 2006** Genética da conservação.
Sociedade Brasileira de Genética.
- 2006 - 2006** II jornada acadêmica da biomedicina da fffcmpa. (Carga horária: 9h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
- 2005 - 2005** Extensão universitária em Curso de Terapia Gênica. (Carga horária: 20h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
- 2005 - 2005** Extensão universitária em Curso de Imunologia Básica. (Carga horária: 20h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
- 2005 - 2005** Extensão universitária em II jornada acadêmica de biologia. (Carga horária: 14h).
UFRGS.
- 2005 - 2005** I Curso de Manipulação Genética. (Carga horária: 8h).
Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- 2005 - 2005** Comunicação celular no sistema nervoso.
Federação das Sociedades de Biologia Experimental.
- 2004 - 2004** Extensão universitária em Jornada Acadêmica de Biologia. (Carga horária: 12h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
- 2004 - 2004** Dos cromossomos para a microgenômica no estudo do. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética.
- 2003 - 2003** Discussão sobre Pesquisa utilizando células tronco. (Carga horária: 10h).
Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- 2003 - 2003** Teacher Training Course. (Carga horária: 15h).
Help Oficina de Inglês.

Atuação profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional

- 2007 - Atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: mestranda, Carga horária: 40,
Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional

2004 - 2006 Vínculo: Institucional, Enquadramento Funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20

Instituto Geral de Perícias, IGP, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Institucional, Enquadramento Funcional: Estagiário não-remunerado, Carga horária: 30

Áreas de atuação

- 1.** *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Morfologia / *Subárea:* Citologia e Biologia Celular.
- 2.** *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Genética / *Subárea:* Genética Humana e Médica.
- 3.** *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Genética / *Subárea:* Mutagenese.
- 4.** *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Biologia Geral.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Alemão Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2002 2002 State Board of Education Award of Merit, State Board of Education - Ohio, USA.

2002 President's Award for Educational Excellence, President's Education Awards Program.

2002 Certificate of membership - National Honor Society of Secondary Schools, National Honor Society.

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. LEDUR, P. F. ; VILLODRE, E. S. ; LENZ, G. . A role of the purinergic system in the development of cancer stem-cells. In: I Congresso IBRO/LARC de neurociencias da america latina, caribe e peninsula iberica, 2008, Buzios. I IBRO/LARC congress of neurosciences of latin america, the caribbean and iberian peninsula, 2008.
2. SILVA, A. O. ; LOPEZ, P. L. C. ; LEDUR, P. F. ; LENZ, G. . Avaliação do silenciamento do gene de XIAP por RNA de interferencia em linhagens de glioma U87. In: XX Salão de Iniciação Científica, 2008, Porto Alegre. XX Salão de Iniciação Científica, 2008.
3. Campesato, L.F.I. ; BAVARESCO, L. ; CAPPELLARI, A. R. ; BRAGANHOL, E. ; LOPEZ, P. L. C. ; LEDUR, P. F. ; LENZ, G. ; BATTASTINI, A. M. O. . EFEITO DO SILENCIAMENTO DA ECTO-5 - NUCLEOTIDASE/CD73 NA MIGRAÇÃO CELULAR DE LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U138-MG. In: XXIII Reunião Anual da FeSBE, 2008, Águas de Lindóia. XXIII Reunião Anual da FeSBE, 2008.
4. LEDUR, P. F. ; LOPEZ, P. L. C. ; VILLODRE, E. S. ; SILVA, A. O. ; CAMASSOLA, M. ; NARDI, N. ; LENZ, G. . Apoptosis modulation in gliomas by RNA interference and transgene expression using Lentiviral vector. In: VIII São Paulo Research Conferences, 2007, São Paulo. VII São Paulo Research Conferences - Câncer: da Biologia Molecular ao Tratamento, 2007.
5. ZAMIN, L. L. ; CHIELA, E. C. F. ; LEDUR, P. F. ; TAMAJUSUKU, A. S. K. ; SALBEGO, C. G. ; LENZ, G. . Resveratrol and Quercetin decreases the cell number and viability in several glioma lineages. In: VIII Sao Paulo Research Conferences, 2007, Sao Paulo. VIII Sao Paulo Research Conferences - Cancer: da Biologia Molecular ao Tratamento, 2007.
6. SILVA, A. O. ; LOPEZ, P. L. C. ; LEDUR, P. F. ; LENZ, G. . Avaliação do silenciamento do gene de Survivina por RNAi em linhagens de glioma U87. In: XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre. XIX Salão de Iniciação Científica, 2007.
7. LEDUR, P. F. ; SILVA, F. H. ; TAMAJUSUKU, A. S. K. ; LENZ, G. . EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES APOPTÓTICOS EM LINHAGENS DE GLIOMAS. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre. XVIII Salão de iniciação científica, 2006.
8. LEDUR, P. F. ; SILVA, F. H. ; CAMASSOLA, M. ; DELGADO-CANEDO, A. ; DALBERTO, T. P. ; NARDI, N. ; LENZ, G. . Produção de Vetores Lentivirais através de calfecção. In: Salão de Iniciação Científica, 2005, Porto Alegre. Livro de Resumos - Ciências Biológicas - Biologia Celular C. Porto Alegre, 2005. p. 163-163.

Apresentações de Trabalho

1. LEDUR, P. F. ; ARAUJO, A. M. . Iniciação Científica em Relatos. 2004. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos

1. I IBRO/LARC Congress of Neurosciences of Latin America, the Caribbean and Iberian Peninsula. A role of the purinergic system in the development of cancer stem cells. 2008. (Congresso).
2. VIII Sao Paulo Research Conferences - Cancer: da Biologia Molecular ao Tratamento. Apoptosis modulation in gliomas by RNA interference and transgene expression using lentiviral vector. 2007. (Congresso).
3. 52 congresso brasileiro de genética. 2006. (Congresso).
4. Simpósio Pesquisa Pré-clínica e clínica em terapia gênica e celular. 2006. (Simpósio).
5. XVIII Salao de Iniciacao Cientifica. Expressao diferencial de genes apoptoticos em linhagens de gliomas. 2006. (Outra).
6. XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). 2005. (Congresso).
7. International Symposium of Advanced Therapies 2005. 2005. (Simpósio).
8. XVII Salao de Iniciacao Cientifica. Producao de vetores lentivirais atraves de calcfeccao. 2005. (Outra).
9. Congresso Brasileiro de Genética. 2004. (Congresso).