

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

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO E SEU ENVOLVIMENTO NA  
PROGRESSÃO DE MEDULOBLASTOMAS**

**ANGÉLICA REGINA CAPPELLARI**

DRA. ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI

Orientadora

DR. ALEXANDER HENNING ULRICH

Co-Orientador

Porto Alegre

2013

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

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO E SEU ENVOLVIMENTO NA  
PROGRESSÃO DE MEDULOBLASTOMAS**

**ANGÉLICA REGINA CAPPELLARI**

DRA. ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI

Orientadora

DR. ALEXANDER HENNING ULRICH

Co-Orientador

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

Porto Alegre

2013

**Dedico este trabalho especialmente  
Aos meus pais Sônia e Roberto,  
Claudius meu amor  
e a minha filha, minha querida Joana.**

*“A ciência ainda não nos provou se a loucura é ou não o mais sublime da inteligência.”*

*Edgar Allan Poe*

## AGRADECIMENTOS

---

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus. Por ter me concedido toda a força e saúde necessária para conseguir alcançar meu objetivo, toda a lucidez para realiza-lo e toda a sabedoria para administrar todos os encaixos da vida durante esta árdua caminhada e conseguir, enfim, chegar até aqui.

Gostaria de agradecer enormemente ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, por toda a colaboração e estrutura para o desenvolvimento deste projeto e ao CNPq, pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado sanduíche, com as quais fui contemplada no decorrer do meu doutorado.

Agradeço também,

De forma muito especial, à Professora Ana, minha orientadora. Tu és para mim um exemplo de profissional por ser tão organizada e correta acima de tudo, que ama o que faz e se dedica inteiramente a isso e não tens medo de dizer que é isso que gostas de fazer. Diante de tantas dificuldades, estás sempre lutando pela sua pesquisa, por seu laboratório e por nós, seus alunos. Obrigada por ter me dado a oportunidade de realizar meu projeto, por ter aceitado torná-lo realidade, por sempre dizer sim às minhas ideias mirabolantes, por ter sido compreensiva quando estive longe, por ter sido dura quando foi necessário e por ter sido tão amiga e amável em outros momentos. Orgulho-me de ter sido sua orientada durante todos estes anos e espero que nossa “separação” nunca aconteça. Tu me ensinaste o amor pelas ectonucleotidases e junto contigo quero estudá-las muito mais.

Ao Professor Henning meu co-orientador. Pelo grande mestre e pesquisador que és, por ter me aceitado em seu laboratório e por toda sua ajuda e participação neste trabalho. Por ser sempre uma pessoa amiga e gentil. Espero que nossas colaborações sejam duradouras e proveitosas tanto quanto foi durante a realização deste trabalho. Mais uma vez, muito obrigada.

À Doutora Ana Lucia Abujamra do Instituto do Câncer Infantil, por toda a ajuda e colaboração neste trabalho.

À Doutora Francine Hehn, do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela importante ajuda na fase final deste trabalho, por sua colaboração e compreensão.

Aos queridos amigos do laboratório de neurociências da USP, que me acolheram e fizeram com que minha estada em São Paulo fosse muito mais agradável. Telma, Arquimedes, Sophia, Arthur, Talita, Hélio, Claudiana, Denise, Priscila, Cleber, Isis e todos os outros que por ali passaram durante o período em que estive lá. Um sincero obrigado.

Obrigada em especial à minha amiga lindona, a Mi. Obrigada por sempre me ouvir, por me ajudar, por ser minha companheira nos momentos mais difíceis que passei quando estava em São Paulo. Teu apoio e companheirismo foram imprescindíveis para chegar até aqui.

Juuuuuuuuuu, tu mereces um super obrigado! Tu me acolheste na sala da tua casa quando cheguei a São Paulo. Gostei de ti de graça e espero levar sua amizade pra vida toda. Obrigada pelas discussões de resultados, pelas dicas de protocolos, por tudo isso e mais um pouco, te agradeço de coração.

Ao amigo Eliezer, por toda a amizade dedicada quando estive em São Paulo.

Obrigada à Fabrícia, amiga querida que também mora em meu coração e a todos os amigos do laboratório 22. Esse lab é minha segunda casa e vocês são minha família. Franciane, Manuella, Elisa, Carol, Mariana, Vanessa, Fabiana, Letícia e o “bendito fruto” Fabrício, vocês tornam o trabalho muito mais fácil, muito mais alegre. A companhia de vocês é incontestavelmente maravilhosa. Sou muito feliz por fazer parte deste grupo.

À Elizandra, por toda sua participação, apoio, amizade e exemplo de uma excelente pesquisadora.

À querida Liliana, Lila, Liloca, amiga, querida, irmã! Obrigada simplesmente por tudo... Por fazer parte da minha vida!

Ao Matheus e a Fran e também ao Marcelo e a Fabiele, pela grande amizade e companheirismo.

Aos meus muitíssimo queridos compadres Orlando e Maira. Pelas incontáveis jantas, conversas, chimarrões. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Vocês fazem parte da minha família e moram no meu coração.

Aos meus cunhados, em especial à Marlene, por ser muito mais que cunhada, ser amiga, confidente... Minha irmã também. Obrigada pelas indicações de livros de literatura e pelos mates com conversas de cansar a língua de tanto falar. Simplesmente obrigada por inúmeras vezes ser minha pequena grande companheira.

Aos meus queridos avós Íris e Rene, por seu incontestável carinho. Ao João pelo apoio e por cuidar dos meus bens mais preciosos e a todos os demais familiares pela torcida e compreensão por eu estar sempre longe nos momentos de família reunida.

Ao meu sogro, Seu José, por todo seu apoio diário, sua companhia agradável, por todo seu carinho e atenção, por todo o zelo que tens comigo, por seu carinho de pai! E claro, por sempre me atualizar sobre as novelas quando não posso assistir e por seus feijões deliciosos.

Ao meu pai, por sempre torcer por mim, por ficar feliz com minhas conquistas e estar sempre ao meu lado. Aos meus irmãos Alessandra e Eduardo e, especialmente, à minha maninha Alana, que é e sempre será meu raio de luz.

À minha mãe, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, me dando forças e confortando minhas angustias com suas palavras amigas, meigas e sábias, por comemorar comigo cada momento de alegria, por vibrar, por torcer... Por sua sabedoria de mãe, por ser para mim um exemplo de mulher, um exemplo de vida!

Por último, mas de uma forma não menos especial, quero agradecer ao meu amor, ao Claudius. Por todo o seu companheirismo, paciência, por todo o seu incondicional apoio principalmente nesta fase final do doutorado. Sem você eu não teria conseguido! Tu me destes força sempre que precisei... Esta tese doutorado também é tua!

# SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVI</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>XVII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>- 2 -</b>
1.1 Meduloblastomas .....	- 2 -
1.1.1 Generalidades .....	- 2 -
1.1.2 Classificação.....	- 2 -
1.1.3 Diagnóstico.....	- 5 -
1.1.4 Tratamento .....	- 6 -
1.1.5 Marcadores histológicos e alterações moleculares.....	- 8 -
1.1.6 Tumorigênese dos MB .....	- 8 -
1.2 Sistema Purinérgico.....	- 11 -
1.2.1 Nucleotídeos extracelulares.....	- 11 -
1.2.2 Receptores Purinérgicos.....	- 15 -
1.2.3 Família das Ectonucleotidases .....	- 20 -
1.2.3.1 NTPDases.....	- 21 -
1.2.3.2 NPPs e Fosfatases alcalinas .....	- 22 -
1.3 Sistema Purinérgico e Câncer .....	- 26 -
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>- 32 -</b>
2.1 Objetivos Gerais.....	- 32 -
2.2 Objetivos Específicos.....	- 32 -
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>- 34 -</b>
3.1 Artigo 1 .....	- 34 -

3.2 Artigo 2 .....	- 71 -
3.3 Artigo 3 .....	- 83 -
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>- 121 -</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>- 137 -</b>
5.1 Conclusões gerais.....	- 137 -
5.2 Conclusões específicas.....	- 137 -
<b>6 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>- 141 -</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>- 143 -</b>
<b>8 Anexos .....</b>	<b>- 155 -</b>
8.1 Outros artigos científicos publicados durante o período do doutorado.....	- 155 -
8.2 Cópia do certificado de aprovação do comitê de ética para o desenvolvimento dos experimentos com o uso de animais.....	- 156 -
8.3 Instruções das revistas aos autores para submissão de artigo científico .....	- 158 -
8.3.1 Artigo 1: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology .....	- 159 -
8.3.2 Artigo 3: Cancer Letters.....	- 172 -

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

**ACR** – Regiões conservadas da apirase (*Apirase conserved regions*)

**ADA** – Adenosina deaminase (*Adenosine deaminase*)

**ADO** – Adenosina (*Adenosine*)

**ADP** – Adenosina difosfato (*Adenosine diphosphate*)

**AMP** – Adenosina monofosfato (*Adenosine monophosphate*)

**AMPC** – Adenosina monofosfato cíclico (*Cyclic Adenosine monophosphate*)

**AP** – Fosfatase alcalina (*Ecto-alkaline Phosphatase*)

**APC** – do inglês *Adenomatous Polyposis Coli*

**ATP** – Adenosina trifosfato (*Adenosine triphosphate*)

**CDP** – Citidina difosfato (*Citidine Diphosphate*)

**CTP** – Citidina trifosfato (*Citidine Triphosphate*)

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

**GCAP** – Fosfatase alcalina de células germinativas (*Germ cells alkaline phosphatase*)

**GDP** – Guanosina difosfato (*Guanosine Diphosphate*)

**GFAP** – Proteína Ácida Fibrilar Glial (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)

**GSK3 $\beta$**  – Glicogênio cinase sintase 3 beta (*Glycogen syntase kinase 3 beta*)

**GPI** – Glicosil fosfatidilinositol (*Glycosyl phosphatidylinositol*)

**GTP** – Guanosina trifosfato (*Guanosine triphosphate*)

**IAP** – Fosfatase alcalina intestinal (*Intestinal alkaline phosphatase*)

**ICD-O** – Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (*International Classification of Disease for Oncology*)

**IDP** – Inosina difosfato (*Inosine diphosphate*)

**IP3** – Inositol-3-fosfato (*Inositol 1,4,5-triphosphate*)

**IRM** – Imagem de Ressonância Magnética

**LCA** – Células grandes/anaplásico (*Large cells/anaplastic*)

**MB** – Meduloblastoma

**MBEM** – Meduloblastomas de extensiva nodularidade (*Medulloblastoma with Extensive Nodularity*)

**MP** – Membrana Plasmática

**mRNA** – Ácido Ribonucleico – mensageiro (*Messenger Ribonucleic Acid*)

**NAD** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo (*Nicotinamide adenine dinucleotide*)

**NDP** – Nucleosídeo difosfato (*Nucleoside diphosphate*)

**NMP** – Nucleosídeo monofosfato (*Nucleoside Monophosphate*)

**NPP** – Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (*Ecto-nucleotide pyrophosphate phosphodiesterase*)

**NTP** – Nucleosídeo trifosfato (*Nucleoside triphosphate*)

**NTPDase** – Ecto-nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase (*Ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase*)

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**Pi** – Fosfato inorgânico (*Inorganic phosphate*)

**PKA** – Proteína cinase A (*Protein Kinase A*)

**PLAP** – Fosfatase alcalina placentária (*Placental alkaline phosphatase*)

**PLC** – Fosfolipase C (*Phospholipase C*)

**PNET** – Tumores neuroectodermis primitivos (*Primitive neuroectodermal tumors*)

**PPi** – Pirofosfato inorgânico (*Inorganic pyrophosphate*)

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SHH** – Sonic HedgeHog

**TC** – Tomografia Computadorizada

**TNAP** – Fosfatase alcalina tecido não-específica (*Tissue-nonspecific alkaline phosphatase*)

**UDP** – Uridina difosfato (*Uridina diphosphate*)

**UTP** – Uridina trifosfato (*Uridina triphosphate*)

**VNUT** – Transportador vesicular de nucleotídeos (*Vesicular nucleotide transporter*)

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b> - Principais vias de sinalização intracelular envolvidas com a progressão de diferentes subtipos de MB.....	10
<b>Figura 2</b> – Possíveis vias de liberação do ATP para o meio extracelular.....	14
<b>Figura 3</b> – Estrutura fundamental dos receptores purinérgicos.....	16
<b>Figura 4</b> – Topografia de membrana das principais enzimas representantes da família das ectonucleotidases.....	21

## RESUMO

---

Meduloblastoma é um tipo de tumor neuroepitelial que acomete principalmente o cerebelo de crianças com idade média de aproximadamente nove anos. Estes tumores são identificados como a principal malignidade cerebral entre crianças e são classificados pela Organização Mundial da Saúde como tumores de alto grau. Inúmeras alterações gênicas, cromossômicas e em vias de sinalização têm sido utilizadas como ferramentas para a classificação destes tumores. Alterações evidenciadas no sistema purinérgico, o qual se baseia no estudo das funções desencadeadas pelo ATP e outros nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular têm sido identificadas por favorecerem a progressão de malignidades. Tais funções são mediadas pela ativação de um amplo grupo de receptores purinérgicos denominados P2, e reguladas por uma família de enzimas denominadas ectonucleotidases. Nosso grupo de pesquisa tem publicado resultados que apontam para a íntima relação entre o sistema purinérgico e a progressão de gliomas. No intuito de dar continuidade a estes estudos em outros tumores do sistema nervoso central, o objetivo principal desta tese de doutorado foi caracterizar a expressão e funcionalidade do sistema purinérgico em diferentes linhagens de meduloblastoma humano fazendo uso de técnicas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Observamos que as linhagens Daoy, ONS76 e D283 apresentaram a expressão e funcionalidade dos receptores purinérgicos P2 de forma bastante significativa. Dentre os receptores expressos, enfatizamos os estudos sobre o P2X<sub>7</sub> o qual, quando estimulado por concentrações farmacológicas de ATP desencadeou morte celular na linhagem Daoy de MB humano, confirmando o potencial deste receptor como um eficiente alvo de terapias contra esse tipo de câncer. Na sequência, avaliamos a família das ectonucleotidases, onde observamos que assim como em gliomas, os meduloblastomas apresentam uma baixa capacidade de hidrólise do ATP no meio extracelular e uma alta atividade AMPásica, atribuída a elevada expressão da enzima ecto-5'NT/CD73 pelas linhagens Daoy e ONS76. Já a linhagem D283 apresentou ausência da atividade e expressão desta enzima. Sabendo que a ecto-5'NT/CD73 tem sido descrita por favorecer a progressão de tumores, superexpressamos essa enzima na linhagem D283 e avaliamos o crescimento dos tumores formados após o implante *in vivo*. Observamos que, para os meduloblastomas, a presença da enzima promoveu uma significativa redução no tamanho dos tumores implantados quando comparado com o grupo controle. Esses resultados nos levam a sugerir que a expressão da ecto-5'-NT/CD73 por células de meduloblastoma pode ser considerada um marcador de prognóstico assim como ser utilizada como um possível alvo terapêutico no tratamento desta malignidade. Por fim, de uma forma geral, mostramos o funcionamento do sistema purinérgico em mais um tipo de tumor e que a sua modulação pode servir, de diferentes formas, como ferramenta para o controle da progressão de meduloblastomas.

## ABSTRACT

---

Medulloblastoma is a kind of neuroepithelial tumor that mainly affects the cerebellum of children with median age of nine years old. These tumors are identified as the principal brain malignancy in children and are classified by the World Health Organization as tumors of high malignancy. Numerous genetic mutations as well chromosomal and signaling pathways alterations have been used as tools to classify these tumors. Changes in the purinergic system, which is based on the study of functions triggering by ATP and others nucleotides and nucleosides into the extracellular medium, have been described to favoring the malignancies progression. These functions are mediated by stimulation of a broad group of purinergic receptors named P2 and regulated by enzymes family called ectonucleotidases. Our research group has published results that indicate the relationship between the purinergic system and the glioma progression. In view of the continuation of these studies in other tumors of the central nervous system, the main objective of this thesis was to characterize the expression and function of the purinergic system in different human medulloblastoma cell lines making use of *in vitro* and *in vivo* techniques. We observe that Daoy, ONS76 and D283 showed the pronounced expression and function of P2 purinergic receptors. Among the expressed receptors we highlight the studies about the P2X<sub>7</sub>. When stimulated by pharmacological ATP concentrations it triggered cell death in Daoy cell line, confirming the potential of this this receptor as a target for effective cancer therapies. Considering the necessity for the modulation of this system, we evaluated at the sequence the ectonucleotidases family. We observed that the medulloblastoma cell lines presented reduced ATP hydrolysis in the extracellular medium and presented a prominent AMP hydrolysis which was attributed to ecto-5'NT/CD73 expression presented by Daoy and ONS76 cell lines. D283 cell line did not shown expression or activity attributed to this enzyme. Knowing that ecto-5'NT/CD73 has been described to favor the tumor progression, we performed the overexpression of this enzyme in the D283 cell line and its functionality was evaluated in an *in vivo* xenograph tumor model. The overexpression of this enzyme caused a significant reduction in the implanted tumors growth when compared to the control group. These results lead us to suggest that the expression of ecto-5'NT/CD73 by medulloblastoma might be considered as a prognostic marker and can be planned to be used as a therapeutic target in the treatment to this malignancy. Overall, we show the purinergic system functionality in another type of tumor and that its modulation might be suggested as a tool to control of medulloblastoma progression.

## **APRESENTAÇÃO**

---

Esta tese está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Resultados, Discussão, Conclusões, Perspectivas, Referências Bibliográficas e Anexos.

A Introdução apresenta a fundamentação teórica que nos levou a formular as hipóteses propostas da tese, dispostas no item Objetivos.

Na seção Resultados estão expostos os materiais e métodos utilizados para a realização deste trabalho, assim como os resultados obtidos, ambos descritos em formato de artigo científicos completos, publicados ou a serem submetidos para publicação.

A seção Discussão contém uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes artigos científicos.

A seção Conclusões aborda as conclusões gerais da tese.

Na seção Perspectivas estão expostas as sugestões de continuidade deste trabalho que poderão constituir novos projetos científicos, dando continuidade à linha de pesquisa.

A seção Referências Bibliográficas lista as referências utilizadas na redação dos itens Introdução e Discussão da tese.

A seção anexos contém uma lista de outros trabalhos realizados em co-autoria durante todo o período de desenvolvimento do doutorado e as instruções das revistas aos autores para a preparação e submissão de artigos.

# **1. INTRODUÇÃO**

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Meduloblastomas**

### **1.1.1 Generalidades**

Meduloblastoma (MB) é um tipo de tumor neuroepitelial embrionário que ocorre no Sistema Nervoso Central (SNC), mais especificamente na fossa posterior e cerebelo, acometendo preferencialmente crianças. Casos em adultos jovens também são evidenciados com índices bem menos frequentes (Koeller & Rushing, 2003). É considerado o tumor cerebral mais comum entre crianças com idade média de aproximadamente 9,1 anos, afetando preferencialmente o sexo masculino (Gilbertson & Ellison, 2008; Fruehwald-Pallamar *et al.*, 2011; Smoll & Drummond, 2012).

Segundo a Classificação Internacional de Doenças - Oncologia (ICD-O), entre 16 a 25% dos casos de tumores cerebrais entre crianças são MB (Louis *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos da América, estima-se que surjam entre 2 a 5 novos casos a cada 10.000 indivíduos, totalizando uma incidência de 240 novos casos por ano (Grizzi *et al.*, 2008). A média de sobrevivência dos pacientes diagnosticados entre os anos de 2000 a 2005 foi de 5 anos (Massimino *et al.*, 2011).

### **1.1.2 Classificação**

O termo “meduloblastoma” foi introduzido por volta de 1910 pelo patologista americano James Homer Wright. Já em 1925, um grupo de pesquisadores formulou a hipótese de que estes tumores eram provenientes de um grupo de células embrionárias chamadas “meduloblastos”. No

entanto, a falta de comprovações científicas que confirmassem a real origem desta malignidade fez com que os meduloblastomas fossem incorporados a uma família de neoplasias<sup>1</sup> do SNC, denominadas de tumores neuroectodermis primitivos (PNET) (Grizzi *et al.*, 2008; Gilbertson & Ellison, 2008).

Originalmente os PNETs eram considerados tumores cerebrais indiferenciados e de alto grau de malignidade, raramente apresentando diferenciação neuronal ou glial. Este conceito tem sido muito útil para o desenvolvimento de protocolos clínicos que auxiliam no diagnóstico e tratamento de inúmeros tumores do SNC, especialmente aqueles apresentados por crianças (Gilbertson & Ellison, 2008). Contudo, a partir de uma perspectiva patológica, os MB demonstraram uma variedade de subtipos não visualizada entre as demais malignidades compreendidas no grupo PNET. Diante dos fatos, por volta de 1964, iniciaram-se então os primeiros debates sobre a incidência e os diferentes tipos de MB (Gilbertson & Ellison, 2008; Fruehwald-Pallamar *et al.*, 2011) e em 1993 a Organização Mundial da Saúde (OMS) agrupou estes tumores de forma distinta, atribuindo a eles uma nova classificação envolvendo percepções a cerca de sua origem e natureza como um todo (Gilbertson & Ellison, 2008).

A última classificação dos MB publicada pela OMS foi em 2007 (Louis *et al.*, 2007), atribuindo a seguinte subdivisão: Meduloblastoma Desmoplásico<sup>2</sup>, Meduloblastoma de

---

<sup>1</sup> *Neoplasia* – refere-se ao crescimento anormal de um tecido que foge, parcial ou totalmente, ao controle do organismo, tendendo à autonomia e a perpetuação, podendo gerar efeitos agressivos à saúde do indivíduo. (Thuler *et al.*, 2011)

<sup>2</sup> *Desmoplásico* - Do termo desmoplasia que se refere ao crescimento descontrolado de um tecido fibroso ou estroma. É importante enfatizar que a desmoplasia constitui um insulto secundário a um evento inicial, podendo então ocorrer no entorno de neoplasias, gerando uma fibrose densa que circunda a massa tumoral. Este termo está principalmente associado a neoplasias malignas que promovem uma invasão fibrosa no tecido normal circundante (Ayala *et al.*, 2003).

Extensiva Nodularidade, Meduloblastoma de Células Grandes, Meduloblastoma Anaplásico<sup>3</sup> e Meduloblastoma Clássico.

Destas variantes, os MB desmoplásicos compreendem cerca de 7 a 15% dos casos e estão associados a um bom prognóstico para os pacientes (Gilbertson & Ellison, 2008; Massimino *et al.*, 2011). Esta malignidade ocorre preferencialmente na fossa posterior, espalhando-se pelo líquido cerebrospinal, no entanto, a formação de metástases extraneurais é rara (Brandes & Paris, 2004). Apresentam como principal característica uma arquitetura bifásica, composta por regiões nodulares com densos retículos intercelulares e zonas nodulares livres de retículos, nas quais há uma prevalência de um fenótipo neurocítico entre as células tumorais. A desmoplasia, neste caso, caracteriza-se pela deposição de colágeno a qual é mais evidente quando ocorre a invasão das leptomeninges (Gilbertson & Ellison, 2008).

MB de extensiva nodularidade (MBEN) apresentam uma incidência de aproximadamente 3% com prevalência entre pacientes de até 3 anos de idade (Louis *et al.*, 2007; Massimino *et al.*, 2011). Eles diferem dos MB desmoplásicos por exibirem uma arquitetura nodular significativamente expandida e livre de zonas reticulares. Nestas zonas são comumente identificadas populações de células que se assemelham a células de neurocitomas, por apresentarem um mesmo padrão de orientação (Louis *et al.*, 2007).

Por apresentarem inúmeras características em comum, os MB de células grandes e os anaplásicos são estudados e analisados de forma agrupada passando a receber uma denominação específica: MB de células grandes/anaplásicos ou LCA (do inglês large cells/anaplastic)

---

<sup>3</sup> *Anaplásico* – ou anaplasia, refere-se a células maduras ou diferenciadas que passaram por um processo de dediferenciação, ou seja, perdem suas características estruturais e funcionais normais assumindo características de uma célula indiferenciada. Este processo é comum a tumores malignos cujas células são bastante proliferativas, são grandes com um ou mais núcleos bastante evidentes, redondos e densos (Abbas *et al.*, 2007).

(Massimino *et al.*, 2011). Os tumores LCA têm como principal característica células grandes com um ou vários núcleos proeminentes. Adicionalmente, apresentam elevados índices mitóticos e apoptóticos, os quais associados ao marcado pleomorfismo nuclear, caracterizam um prognóstico ruim ao pacientes com incidência de 10 a 20% dentre os MB diagnosticados (Gilbertson & Ellison, 2008; Massimino *et al.*, 2011).

MB clássicos compreendem a grande maioria dos casos de MB (Massimino *et al.*, 2011). Eles são formados basicamente por células pequenas, redondas ou ovaladas podendo ou não apresentar focos de necrose e angiogênese, sendo que a proliferação microvascular é bem mais sutil quando comparada à angiogênese glomerulóide demonstrada por gliomas de alto grau (Gilbertson & Ellison, 2008). Entre os tumores neuroepiteliais é o que apresenta a maior taxa de renovação celular e índice proliferativo. Assim como as demais variantes, apresentam uma maior diferenciação neurocítica do que astrocítica e uma grande capacidade de invadir as leptomeninges (Gilbertson & Ellison, 2008).

### **1.1.3 Diagnóstico**

O histórico clínico registrado dos pacientes que apresentam MB mostra que estes tumores tem um comportamento biológico bastante agressivo. Muitos pacientes apresentam os primeiros sintomas após aproximadamente três meses do início da doença (Koeller & Rushing, 2003). A expansão da massa tumoral promove intensa pressão sobre o tecido cerebral normal e juntamente com a formação de edema podem ocasionar dores de cabeça localizadas à região occipital ou então dores generalizadas, acompanhadas de vômito persistente (com ou sem náusea), sonolência, irritabilidade, comportamento psicótico, convulsões dentre outros sintomas (Koeller

& Rushing, 2003; Mrdak *et al.*, 2012). Com o crescimento do tumor as consequentes lesões cerebelares podem gerar contrações musculares involuntárias, perda da motricidade fina e ainda gerar movimentos involuntários e repetitivos dos olhos (Bartlett *et al.*, 2013).

Tendo em vista que os sintomas apresentados podem remeter a inúmeras outras doenças neurológicas, somente exames mais elaborados como Tomografia Computadorizada (TC) e Imagem de Ressonância Magnética (IRM) podem fornecer dados mais conclusivos para o diagnóstico dos MB (Mrdak *et al.*, 2012). Dentre os inúmeros fatores identificados com estes exames a localização e extensão do tumor, assim como a presença de hidrocefalite, são os mais importantes. Este último pode vir a contribuir para a determinação de um prognóstico ruim para o paciente, por ser o responsável pelo espalhamento de células tumorais para outras estruturas neurais, aumentando o risco de recorrência, assim como a formação de metástases extraneurais (Koeller & Rushing, 2003; Brande & Paris, 2004).

Dos tumores do SNC, os MB constituem a classe mais metastática. Dados da literatura mostram que cerca de 33% dos pacientes apresentam a doença já disseminada no momento do diagnóstico (Koeller & Rushing, 2003; Schmidt *et al.*, 2010). A prevalência de metástases extraneurais é de 7,1%, e na maioria dos casos tendem a se manifestar entre 12 a 32 meses após o início do tratamento. Os focos extraneurais atingem preferencialmente os ossos, seguido do fígado, pulmões, pâncreas dentre outros órgãos peritoneais (Koeller & Rushing, 2003).

#### **1.1.4 Tratamento**

A cirurgia é a primeira opção de tratamento quando os MB são diagnosticados. A extensão da área retirada é um importante fator relacionado à sobrevida do paciente e recorrência

do tumor, onde, quanto maior for a área removida melhor será o prognóstico. O grande viés está relacionado às chances de sequelas permanentes, o que pode impactar sobre a qualidade de vida do indivíduo além de contribuir para o atraso do início de terapias adjuvantes (Brande & Paris, 2004; Massimino *et al.*, 2011).

A radioterapia tem sido aceita como o mais efetivo tratamento após a ressecção cirúrgica, onde as doses de radiação atingem uma média de intensidade de 36 Gy<sup>4</sup> no eixo cranioespinhal e 56 Gy na fossa posterior. A eficiência desta terapia tem sido associada com a intensidade da radiação utilizada, no entanto, para cada faixa etária têm-se uma determinada intensidade de radiação permitida para ser aplicada. Os adultos recebem as doses mais elevadas, acima de 50 Gy e nota-se que nestes casos a recorrência é tardia e a média de sobrevida maior. Em crianças, a radiação pode gerar significativas sequelas neurocognitivas, principalmente em pacientes muito jovens. Sendo assim, a intensidade das doses é reduzida para 23,5 Gy. Com isto, este tratamento deixa de ser tão efetivo e a recorrência passa a ser mais breve e a sobrevida dos pacientes menor. Nestes casos, a fim de contornar este viés, indica-se o uso de quimioterapia como um adjuvante no tratamento (Brande & Paris, 2004; Massimino *et al.*, 2011).

O uso da quimioterapia ainda é bastante discutido para os MB, pois não se sabe em que momento ao certo ele pode ser eficaz. Aplicações antes da radioterapia podem retardar o início deste tratamento que é o mais convencional e efetivo. Os agentes quimioterápicos utilizados, quando esta alternativa é aplicada, são a cisplatina, vincristina, lomustina, etoposídeo e a ciclofosfamida (Brande & Paris, 2004, Schmidt *et al.*, 2010).

---

<sup>4</sup> Gy – Consiste no símbolo para Gray, que representa a unidade de dose de radiação ionizante absorvida, a qual é definida como a quantidade que deposita 1 Joule (J) de energia por quilograma (Kg) no meio absorvedor, sendo 1 Gy = 1 J/Kg. Gray é uma unidade de medida do Sistema Internacional de Medidas e este nome foi dado em homenagem à Louis Harold Gray (1905 – 1965), um radiologista britânico.

### **1.1.5 Marcadores histológicos e alterações moleculares**

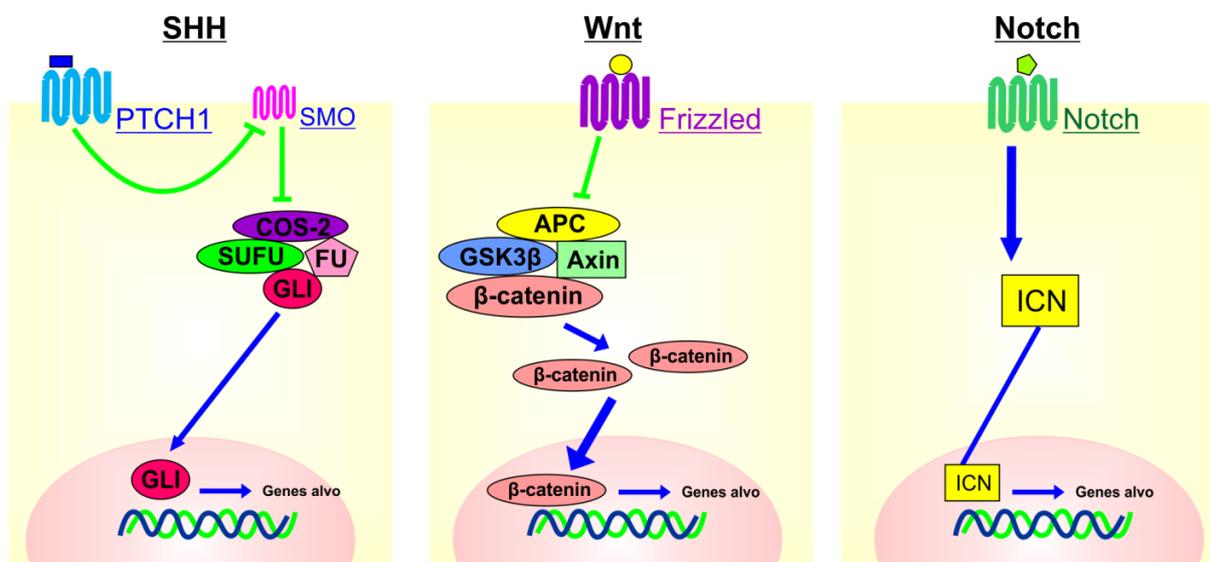
Os MB, dentre os tumores embrionários do SNC, podem apresentar marcadores tanto para linhagens neuronais, a sinaptofisina, como astrocíticas, a proteína acídica fibrilar glial (GFAP) (Gilbertson & Ellison, 2008). Outros marcadores neuronais específicos para MB também são incorporados hoje na determinação histológica destes tumores, como a enolase e a gromogranina (Louis *et al.*, 2007). O Ki-67 (marcador de proliferação celular) funciona como um importante marcador de frações de crescimento celular, mas nem ele, nem os outros mencionados acima, fornecem informações suplementares que possam auxiliar na definição do comportamento biológico dos tumores ou mesmo fornecer alguma resposta para um possível tratamento (Gilbertson & Ellison, 2008).

Quanto às alterações genéticas mais comuns, têm-se identificado mutações no cromossomo 17 como uma das mais comuns em MB, sendo mais frequente no subtipo LCA, sugerindo que esta alteração genética esteja associada com fenótipos mais agressivos, assim como ampliações nos oncogenes MYCC e MYCN (Brandes & Paris, 2004; Huse & Holland, 2010). Em contraste, a monossomia no cromossomo 6 é associada a um prognóstico favorável aos pacientes, principalmente em MB Clássicos que apresentam o cromossomo 17 intacto e possuem alterações no gene para  $\beta$ -catenina. Alterações no cromossomo 9 são observadas frequentemente nos MB desmoplásicos e raramente nos Clássicos (Gilbertson & Ellison, 2008).

### **1.1.6 Tumorigênese dos MB**

Existem hoje três teorias que postulam a possível origem dos MB, todas fundamentalmente baseadas na origem a partir de células indiferenciadas. A primeira proposta sugere que a própria camada granular externa do cerebelo seja um sítio de origem. Isso se deve ao fato de que ela é a principal fonte de células indiferenciadas nesta estrutura cerebral e controla a diferenciação neuronal local, uma das características histológicas dos MB (Koeller & Rushing, 2003). A segunda teoria expõe o conceito de que todos os MB são PNET (tumores neuroectodermais primitivos), baseando-se nas características histológicas comuns apresentadas por ambos. No entanto, dados na literatura apontam para diferenças principalmente genéticas entre eles, lançando dúvidas sobre esta teoria (Giangaspero *et al.*, 2000). Já a terceira hipótese, a qual é mais aceita, propõe que os MB sejam originados de mais de um tipo celular. Isto se justifica pelas características imunorreativas apresentadas pelas células tumorais onde algumas remetem à células presentes no desenvolvimento do sistema ventricular e outras à células derivadas da camada granular externa do cerebelo (Giangaspero *et al.*, 2000).

Mas o que levaria estas células indiferenciadas a mudarem o curso de seu processo de diferenciação e levarem à formação de células tumorais? Inúmeros estudos apontam que a tumorigênese dos MB é fortemente relacionada com a desregulação de vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento normal do cerebelo (Massimino *et al.*, 2011). As principais vias de sinalização intracelulares relacionadas a este processo, assim como no comportamento biológico dos MB, são a Sonic HedgeHog (SHH), a Wnt e a Notch (Figura 1) (Schmidt *et al.*, 2010).



**Figura 1** - Principais vias de sinalização intracelular envolvidas com a progressão de diferentes subtipos de MB: SHH (PTCH 1 - Patched 1; SMO – Smoothened protein; COS-2 – Costal-2; FU – Fused; SUFU – Supressor of fused); Wnt (APC – Adenomatosis polyposis coli; GSK3β – Glycogen Synthase 3β); Notch (ICN – Intracellular Notch domain).

A via SHH medeia a transdução de sinal que promove o crescimento durante o desenvolvimento cerebelar, sendo sua função mais evidente nas células precursoras granulares que originam os neurônios da camada granular externa. Aproximadamente 30% dos pacientes diagnosticados com MB apresentam mutações em efetores desta via, principalmente em PATCH1 e SUFU, os quais resultam na superativação da mesma, gerando uma acelerada proliferação celular (Gilbertson & Ellison, 2008; Huse & Holland, 2010; Schmidt *et al.*, 2010).

A segunda via bastante envolvida na formação dos MB é a Wnt, a qual regula a proliferação de células tronco e células progenitoras presentes na zona ventricular do embrião e na zona subventricular após o nascimento (Fan & Eberhart, 2008). A ativação de seus receptores específicos Frizzled, gera a desestabilização de um complexo multi-proteico, no qual

observamos a presença das proteínas APC e GSK3 $\beta$ , dentre outras. Com isso há uma diminuição na degradação da  $\beta$ -catenina, favorecendo sua translocação para o núcleo celular e a ativação de fatores de transcrição, em sua maioria, associados com a proliferação celular (Polaskis, 2000). Alterações genicas em APC e  $\beta$ -catenina são observadas em aproximadamente 15% dos MB, geralmente relacionadas ao subtipo desmoplásico, e estão associadas com um bom prognóstico para os pacientes (Ellison *et al.*, 2005).

Adicionalmente, a via de sinalização Notch também é superexpressa em alguns subtipos de MB e tem sido relacionada com uma baixa média de sobrevida dos pacientes. Assim como as demais vias apresentadas, ela também possui mutações em seus efetores que levam à transcrição descontrolada de genes, dentre eles Hes-1, que está intimamente associada com a estimulação da proliferação celular e com o bloqueio da diferenciação neuronal. Dentre os subtipos desta proteína, a mais encontrada nos MB é a Notch2 sendo detectada em 15% dos casos analisados (Guessous *et al.*, 2008).

A determinação das vias que estão ativadas nas amostras de MB retiradas dos pacientes pode auxiliar na classificação do tumor, assim como favorecer a elucidação da biologia do mesmo, e, juntamente com as demais características observadas nos exames, permitir a determinação do prognóstico do paciente e a prescrição de um tratamento mais adequado (Guessous *et al.*, 2008).

## **1.2 Sistema Purinérgico**

### **1.2.1 Nucleotídeos extracelulares**

Nas células, a energia é fornecida pela oxidação de “combustíveis metabólicos”, tais como carboidratos, lipídeos e proteínas. A oxidação dessas moléculas resulta na liberação de energia livre que pode ser estocada em ligações fosfoanidras presentes em moléculas como adenosina tri-fosfato (ATP), adenosina di-fosfato (ADP), assim como outras moléculas fosfatadas. Dentre elas, o ATP é o link efetivo e central, constituindo a molécula chave nos processos celulares de troca de energia, através da hidrólise ou transferência do grupo fosfato terminal (Bonora *et al.*, 2012).

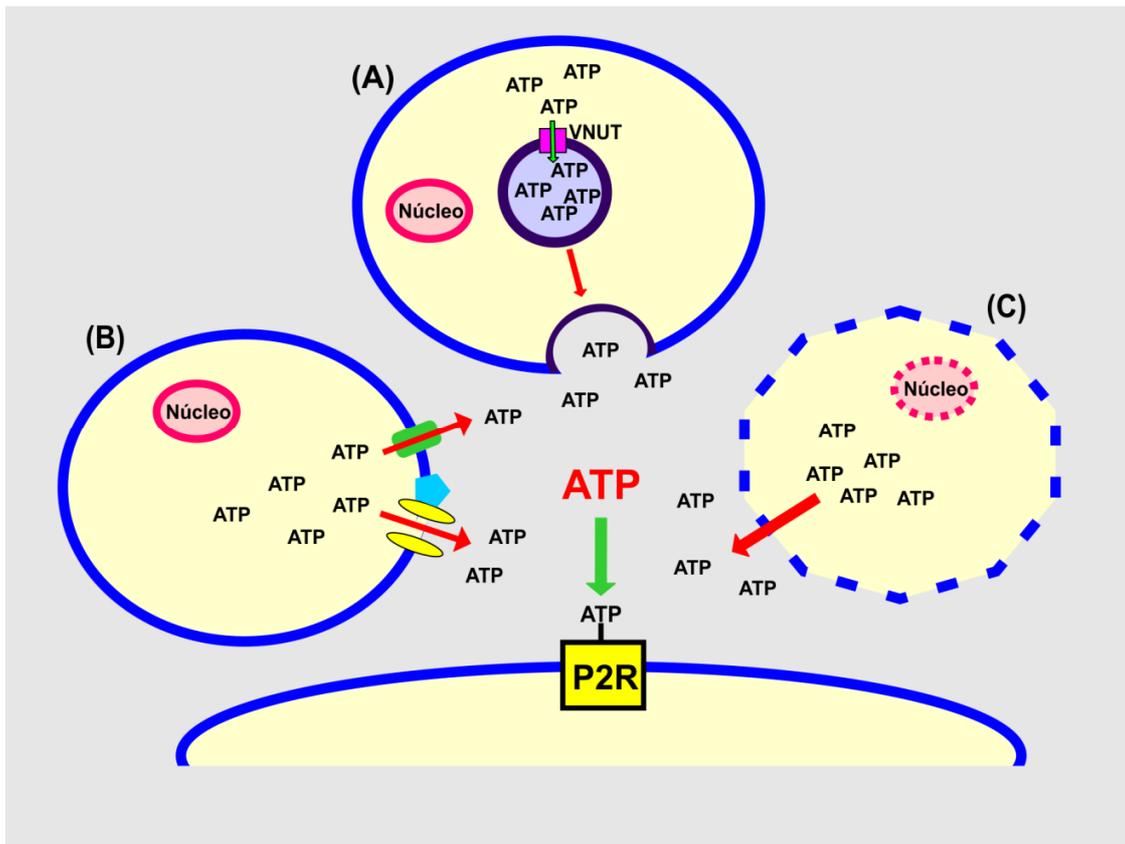
Não seria nada surpreendente que o ATP tenha sido utilizado como uma molécula de sinalização ao mesmo tempo em que tenha sido explorado como uma fonte de energia intracelular. De fato, o ATP é provavelmente uma das moléculas de sinalização mais antigas que surgiram durante a evolução dos organismos vivos (Rayah *et al.*, 2012). Tanto ele como a adenosina (ADO), produto de sua hidrólise, são neurotransmissores e neuromoduladores bem reconhecidos no SNC e periférico. Além disso, suas ações como moléculas sinalizadoras estão bem estabelecidas em outros sistemas, tais como cardiovascular, imune e endócrino dentre outros (Burnstock, 2008; Rayah *et al.*, 2012).

Usualmente, as concentrações de ATP dentro das células atingem a faixa de milimolar. Mesmo assim, devido a sua importância em processos metabólicos e sua baixa estabilidade em meio aquoso, o conteúdo de ATP pode ser rapidamente depletado se não for imediatamente repostado (Bonora *et al.*, 2012). No entanto, pesquisas com mamíferos mostram o ATP sendo estocado dentro de grandes vesículas citoplasmáticas juntamente com outros neurotransmissores, tais como acetilcolina, noradrenalina e glutamato em diferentes estruturas cerebrais. Em astrócitos, mais especificamente, foram encontradas pequenas vesículas sinápticas contendo apenas ATP (Yamboliev *et al.*, 2009).

Por um longo tempo assumiu-se que a única forma de liberação de nucleotídeos, em especial o ATP, para o meio extracelular era através de um dano ou lise total da célula, em decorrência a eventos diversos de injúria mecânica ou citotoxicidade. Hoje, evidências sugerem que a liberação destas moléculas pode também ocorrer por exocitose ou ainda via carreadores presentes na membrana plasmática (Figura 2) (Bodin & Burnstock, 2001; Corriden & Insel, 2010; Junger, 2011). A ocorrência exocítica da liberação do ATP é firmemente suportada pela demonstração de grânulos secretórios e/ou vesículas, isolados de tecidos exócrinos e neuroendócrinos que o estocam (Lazarowski, 2012). Dados recentes mostram a caracterização de um transportador vesicular de nucleotídeos (VNUT), o qual contribui para o armazenamento do ATP em vesículas e sua liberação exocítica em uma ampla variedade de tecidos (Abbracchio *et al*, 2009; Sawada *et al*, 2008). Adicionalmente, duas classes de canais transmembrana foram relacionadas com o transporte de ATP para o meio extracelular: canais aniônicos, como por exemplo, os canais de Cl<sup>-</sup> e ainda canais que formam grandes poros na membrana, como os associados a conexinas, panexinas e o próprio P2X<sub>7</sub>, um receptor purinérgico (Lazarowski, 2012). Sugere-se ainda que a liberação do ATP seja regulada, e em muitos casos, acompanhada por nucleotídeos UTP e UDP (Burnstock 2006a; Yegutkin, 2008).

Uma vez no meio extracelular os nucleotídeos atingem concentrações na ordem de nanomolar (Di Virgilio, 2005) e interagem com receptores específicos, chamados receptores purinérgicos. Por fim, são degradados por uma ampla família de ectoenzimas que controlam suas concentrações extracelulares assim como modulam a amplitude de suas funções (Czajowski & Baranska, 2002). Ao ativarem seus receptores, eles desencadeiam importantes e diferentes efeitos sobre inúmeros processos biológicos incluindo contração muscular, secreção endócrina e

exócrina, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dor, modulação das funções cardíacas e neurotransmissão (Ralevic & Burnstock, 1998; Sträter, 2006).



**Figura 2** – Possíveis vias de liberação do ATP para o meio extracelular. (A) Secreção vesicular; (B) Condução via canais ou poros; (C) Secreção via extravasamento do conteúdo intracelular devido a lise da célula.

Dependendo do subtipo de receptor purinérgico existente na célula e as vias de sinalização possivelmente envolvidas, a estimulação via nucleotídeos extracelulares pode mediar

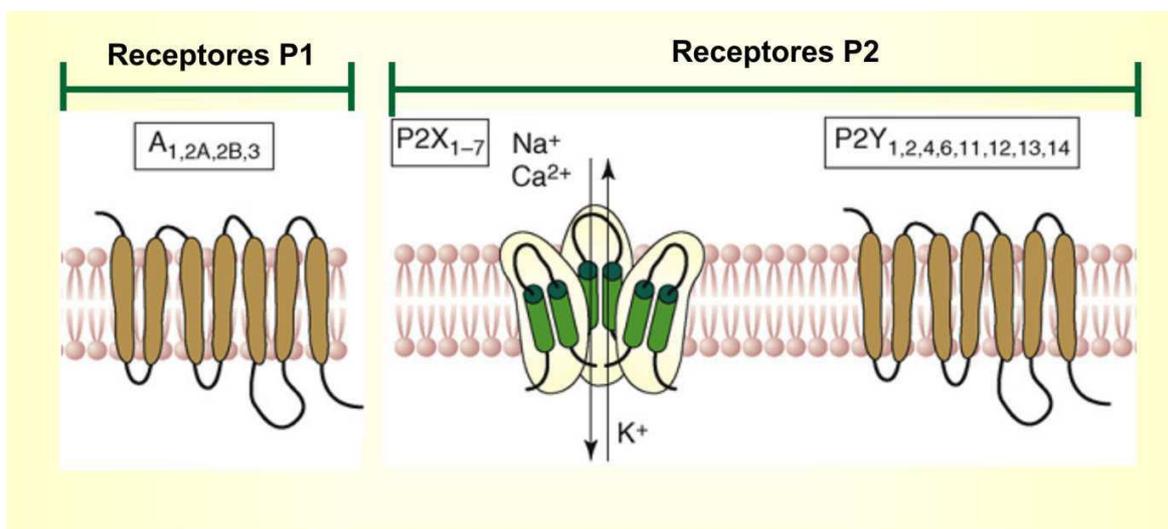
uma resposta de curto prazo (resposta aguda) ou mesmo desencadear processos que afetam o metabolismo celular como um todo incluindo adesão celular, ativação da célula e migração (Robson *et al*, 2006). Além da ampla e ubíqua participação em eventos fisiológicos atribuídos aos agonistas purinérgicos, é também evidenciada a participação destes em importantes eventos patológicos, onde a elevada concentração de ATP no meio extracelular tem sido considerada uma potencial causa em eventos neurodegenerativos (Franke *et al*, 2006). Adicionalmente, elevadas concentrações extracelulares não apenas de ATP, mas também de adenosina, podem favorecer a proliferação e progressão de tumores, tais como gliomas (Spychala 2000, Morrone *et al*, 2003).

### **1.2.2 Receptores Purinérgicos**

O sistema de sinalização purinérgica é, indiscutivelmente, um dos principais sistemas de sinalização extracelular que integra circuitos celulares funcionais no SNC, onde purinas e pirimidinas medeiam a sinalização recíproca entre neurônios e astrócitos, em diferentes estruturas cerebrais através da ativação de uma ampla família de receptores, nomeados receptores P1 e P2 (Verkhasky *et al.*, 2009). Esta denominação foi primeiramente descrita em 1978, por Geoffrey Burnstock, quando ele propôs que estes eram subdivididos em receptores P1, sensíveis à adenosina e receptores P2, sensíveis aos ATP e ao ADP (Burnstock, 1978). Esta divisão permanece como uma parte fundamental da classificação dos receptores purinérgicos, embora os receptores P1 e P2 sejam agora caracterizados primariamente de acordo com sua estrutura molecular, suportada por evidências de distintos sistemas efetores, perfis farmacológicos e distribuição tecidual (Ralevic & Burnstock, 1998).

### 1.2.2.1 Receptores P1

Os receptores P1 são receptores sensíveis às variações na concentração de adenosina presente no meio extracelular. São descritos quatro subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, com distintas propriedades farmacológicas entre si (Ralevic & Burnstock, 1998). Todos eles são acoplados à proteína-G e assim como outros receptores desta categoria, apresentam sete domínios transmembrana. Estes domínios são formados por estruturas em  $\alpha$ -helice compostas por 21 a 28 amino ácidos hidrofóbicos, com a calda N-terminal voltada para o meio extracelular e a C-terminal para o meio intracelular (Figura 3) (Ralevic & Burnstock, 1998; Fredholm *et al.*, 2001).



**Figura 3** – Estrutura fundamental dos receptores purinérgicos (adaptado de Abbracchio *et al.*, 2009).

Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  são acoplados a proteínas  $G_{i/o}$ , as quais exercem funções inibitórias sobre a enzima adenilato ciclase. Já os receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  são acoplados a proteína  $G_s$  e ativam a produção de AMPc (adenosina monofosfato cíclico). Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  exercem função sobre a enzima fosfolipase C (PLC), estimulando a síntese de inositol-3-fosfato (IP3). Em alguns tipos celulares o receptor  $A_1$  foi descrito por estar envolvido na ativação de canais catiônicos de  $K^+$  e/ou de  $Ca^{++}$  (Ralevic & Burnstock, 1998; Verkhrasky *et al.*, 2009; Abbracchio *et al.*, 2009). Dependendo do tipo celular, outras combinações entre proteínas-G têm sido reveladas e todos os receptores de adenosina foram mostrados por ativar pelo menos uma subfamília de proteínas cinase ativadoras de mitógenos (Schulte & Fredholm, 2003). Os receptores P1 são amplamente expressos e apresentam diferentes afinidades pela adenosina, onde os receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  demonstram uma maior afinidade pelo nucleosídeo ( $K_m < 30\text{nm}$ ), enquanto que os receptores  $A_3$  e, particularmente, o receptor  $A_{2B}$  apresentam baixa afinidade (1-20  $\mu\text{M}$ ) (Ham & Evans, 2012).

No SNC, a adenosina exerce uma multiplicidade de funções, incluindo a modulação de funções neurais e gliais, sinalização entre neurônio-glia e também no desenvolvimento neural. Além disso, a adenosina exerce um importante papel no controle dos sistemas de resposta imune inata e adaptativa. Desregulações no sistema da adenosina estão envolvidas em patologias como epilepsia, desordens neurodegenerativas e condições psiquiátricas (Boison, 2008).

#### *1.2.2.2 Receptores P2X*

Os receptores P2X constituem um grupo de canais catiônicos não seletivos, que são expressos por inúmeras espécies, desde organismos unicelulares até humanos, no entanto, sua filogenia ainda não foi bem estabelecida. O agonista natural para estes receptores é o ATP,

enquanto que seus metabólitos como o ADP e também outros nucleotídeos como UTP e UDP, ativam os receptores P2Y, não exercendo ações sobre os P2X (Coddou *et al.*, 2011).

São identificados sete membros pertencentes a esta classe de receptores: P2X<sub>1-7</sub>, sendo todos canais catiônicos clássicos não seletivos que ao serem ativados pelo ATP, formam canais na membrana plasmática permitindo a passagem de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> (Burnstock, 2006b; Abbracchio *et al.*, 2009). Estes receptores são formados estruturalmente por trimeros proteicos transmembrana (Figura 3), que podem ser classificados como homoméricos, constituídos por subunidades codificadas por um mesmo gene, ou heteroméricos, onde as subunidades são codificadas por genes de diferentes P2X, originando assim novas disposições: P2X<sub>1/2</sub>, P2X<sub>1/4</sub>, P2X<sub>1/5</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>2/6</sub>, P2X<sub>4/6</sub> e P2X<sub>4/7</sub>) (Abbracchio *et al.*, 2009). O receptor homomérico P2X<sub>7</sub> é ativado por concentrações de ATP que variam entre 100 μM e concentrações acima de 1 mM, já os demais receptores podem ser ativados por concentrações de ATP cujo EC50 varia entre 1 a 10 μM (Abbracchio *et al.*, 2009).

Dentre estes receptores, o P2X<sub>7</sub> apresenta a capacidade de formar não apenas estreitos canais de condutância que permitem a passagem de pequenos íons, mas também promove a abertura de grandes poros que são permeáveis a moléculas orgânicas de até 900 Da. Este processo ocorre não apenas pela dilatação do próprio canal originando o poro, mas também pode ocorrer pela associação com outros canais ou transportadores, como por exemplo, a integração que ocorre entre o P2X<sub>7</sub> e os canais panexina (Burnstock, 2006b; Abbracchio *et al.*, 2009; Coddou *et al.*, 2011). Os receptores P2X favorecem principalmente o influxo de Ca<sup>2+</sup>, o qual resulta em um aumento na concentração deste íon no meio intracelular gerando a despolarização da membrana e influenciando em inúmeros processos biológicos, como na liberação de vesículas citoplasmáticas e a própria transdução de sinais entre células neurais (Franke *et al.*, 2006).

### 1.2.2.3 Receptores P2Y

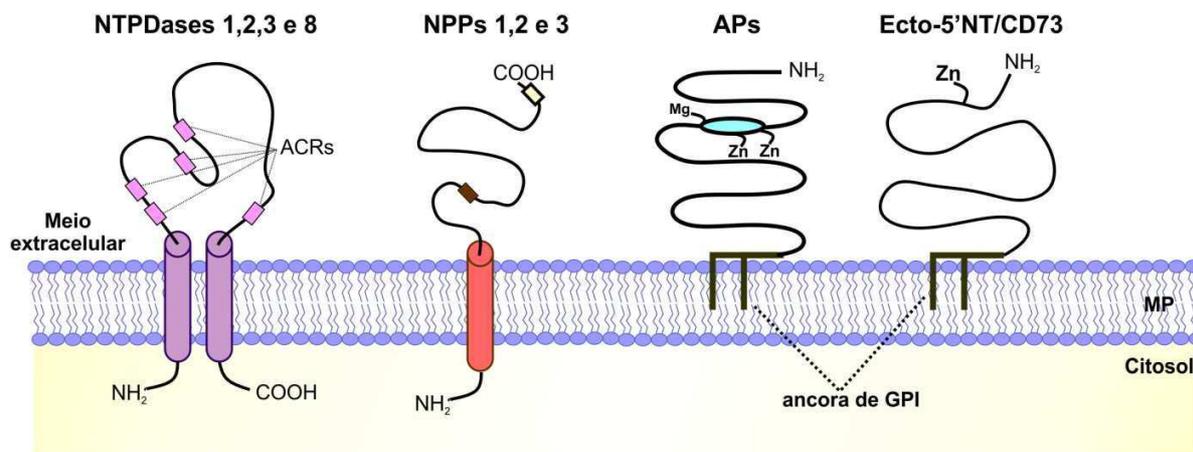
Até o momento foram clonados oito subtipos de receptores pertencentes a esta família: P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>. Assim como os receptores P1, os P2Y são receptores acoplados à proteína-G e apresentam uma topografia composta por sete domínios proteicos transmembrana com a cauda N-terminal voltada para o meio extracelular e a C-terminal voltada para o meio intracelular (Figura 3). Esta última contém sequências específicas que se ligam a proteínas cinases. Alguns domínios transmembrana apresentam uma considerável homologia entre si, o que auxilia na determinação de qual proteína-G o receptor se ligará e ainda, auxilia na determinação da intensidade dessa ligação (Burnstock, 2006b; Abbracchio *et al.*, 2009; Verkhrasky *et al.*, 2009). Levando em consideração a ligação destes receptores à proteína-G, eles são subdivididos em dois grupos: P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub> e P2Y<sub>12,13,14</sub>. Os primeiros são acoplados à proteína-G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>, e regulam a atividade da PLC, controlando assim a liberação de Ca<sup>2+</sup> a partir do retículo endoplasmático, mediada por IP3. O segundo grupo modula a ação de canais iônicos e inibe a ação da enzima adenilato ciclase via proteína-G<sub>i/o</sub> (Burnstock, 2006b; Verkhrasky *et al.*, 2009).

Muitas células expressam múltiplos receptores P2Y. Alguns deles são ativados por nucleosídeos di-fosfatados (P2Y<sub>1,6,12</sub>) enquanto outros são ativados principalmente por nucleosídeos tri-fosfatados (P2Y<sub>2,4</sub>). Adicionalmente, eles podem ser ativados tanto por nucleotídeos púricos como pirimídicos (P2Y<sub>2,4,6</sub>) e outros apenas pelos púricos (P2Y<sub>1,11,12</sub>) (Burnstock, 2006b). Visto que a ativação destes receptores envolve sistemas de sinalização dependentes de proteínas-G e também segundos mensageiros, o tempo de resposta ao estímulo, quando comparados à sinalização via receptores P2X, é mais lento (em torno de 100ms). Mas,

mesmo assim, receptores acoplados à proteínas-G, incluindo os P2Y, foram identificados por modular a atividade de canais iônicos voltagem-dependentes em neurônios e outras células excitáveis (Volonté *et al.*, 2006).

### **1.2.3 Família das Ectonucleotidases**

Uma vez no meio extracelular, os nucleotídeos são hidrolisados por uma cascata enzimática, resultando na formação de seu respectivo nucleosídeo e fosfato inorgânico. Inúmeras pesquisas designam esta atividade hidrolítica a uma família de enzimas inicialmente nomeadas como ecto-ATPases, as quais são capazes de hidrolisar o ATP e ADP no meio extracelular. Com novas descobertas moleculares e funcionais, esta classe foi renomeada, sendo então constituída por inúmeros membros, os quais são ubiquamente distribuídos e agem sobre uma enorme gama de substratos, compondo então a família das ectonucleotidases (Zimmermann, 2000; Zimmermann *et al.*, 2012). Os correntes conhecimentos sobre estas enzimas incluem os seguintes membros: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase – EC 3.6.1.5); Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (NPPs – EC 3.6.1.9/EC 3.1.4.1); Fosfatase alcalina (AP – EC 3.1.3.1); Ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'NT/CD73 – EC 3.1.3.5) e a enzima Adenosina deaminase (ADA – EC 3.5.4.4) (Figura 4), todas elas agem de uma maneira bastante coordenada, controlando a sinalização dos nucleotídeos extracelulares ao hidrolisá-los (Zimmermann, 2000; Robson *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2012).



**Figura 4** – Topografia de membrana das principais enzimas representantes da família das ectonucleotidases, as quais participam ativamente no metabolismo extracelular dos nucleotídeos. ACRs – regiões conservadas da apirase; GPI – glicosil-fosfatidilinositol; MP – membrana plasmática.

### 1.2.3.1 NTPDases

Até o momento foram clonados oito diferentes genes que codificam os membros pertencentes ao grupo das NTPDases. Os subtipos individuais diferem entre si na localização celular e também nas propriedades funcionais (Zimmermann, 2000; Zimmermann *et al.*, 2012). Quatro delas, as NTPDases 1, 2, 3 e 8, são tipicamente localizadas na superfície da membrana plasmática, com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. As NTPDases 5 e 6 exibem localização intracelular e sofrem secreção após estímulos nos tecidos em que são expressas. Mesmo quando secretadas no meio extracelular, elas não interferem na regulação da ativação dos receptores P2 por apresentarem um  $K_d$  muito alto e portanto uma afinidade muito baixa pelos nucleotídeos extracelulares (Robson *et al.*, 2006). Já as NTPDases 4 e 7, apresentam-se inteiramente intracelulares, voltadas para o lúmen de organelas citoplasmáticas como o aparato

de Golgi e o retículo endoplasmático, conseqüentemente também não interferem no metabolismo extracelular dos nucleotídeos (Kukulski et al, 2005; Robson *et al.*, 2006; Yegutkin, 2008). Todos os membros desta subclasse apresentam 5 domínios altamente conservados, denominados “regiões conservadas da apirase” (ACRs), as quais estão intimamente relacionadas com o sitio ativo das enzimas e conseqüentemente fazem referência à atividade catalítica das mesmas (Zimmermann 2000, Zimmermman *et al.*, 2012).

As NTPDases extracelulares 1,2,3 e 8 diferem entre si principalmente pela preferência pelo substrato (Tabela 1). Todas elas requerem concentrações em milimolar de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  para exercerem sua atividade catalítica máxima, sendo que na ausência destes íons tornam-se inativas (Robson *et al.*, 2006). Apresentam uma estrutura altamente glicosilada com peso molecular que varia entre 70 e 80 KDa. Possuem basicamente dois domínios transmembrana, um C-terminal e outro N-terminal, com uma grande alça extracelular, a qual contém as regiões conservadas da apirase (Figura 4) (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008; Zimmermann *et al.*, 2012). A principal função das NTPDases presentes na superfície da membrana plasmática é controlar a disponibilidade de nucleotídeos extracelulares, os quais são agonistas dos receptores purinérgicos P2, e assim contribuir para a manutenção extracelular da homeostase deste sistema (Robson *et al.*, 2006).

#### *1.2.3.2 NPPs e Fosfatases alcalinas*

O subgrupo das NPPs consiste de sete membros já clonados, NPP1 a NPP7, as quais foram numeradas de acordo com sua ordem de descoberta. Estas enzimas apresentam uma ampla especificidade por diferentes substratos, sendo capazes de hidrolisar ligações pirofosfato e

fosfodiester presentes em nucleotídeos, ácidos nucleicos, bem como lisofosfolípidos e ésteres de fosfatidilcolina (Stefan *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2012). Somente os três primeiros membros desta família possuem ampla distribuição tecidual e são capazes de hidrolisar vários nucleotídeos extracelulares sendo então relevantes no contexto da sinalização purinérgica (Goding *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2012). As NPP1 (antígeno de diferenciação plasmática, PC-1), NPP2 (autotaxina, fosfodiesterase 1 $\alpha$ ) e NPP3 (gp130<sup>RB13-6</sup>, B10, fosfodiesterase 1 $\beta$ ) são glicoproteínas transmembrana de aproximadamente 115 KDa, cuja cauda N-terminal é intracelular e a C-terminal extracelular (Figura 4), onde esta última contém dois domínios referentes ao sítio catalítico da enzima, que garantem a homologia existente entre estes três membros (Goding *et al.*, 2003; Stefan *et al.*, 2005; Yegutkin, 2008). Notavelmente, a distinção funcional entre os membros das NPPs e as NTPDases é frequentemente complicada, pois ambas as classes apresentam-se, na maioria das vezes, co-expressas em uma ampla variedade de tecidos de mamíferos e trabalham de maneira coordenada na degradação dos nucleotídeos tri- e difosfatados (Yegutkin, 2008).

As APs são enzimas homodiméricas extracelulares ligadas à membrana plasmática por uma âncora de Glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Figura 4). Seu sítio catalítico contém três íons metálicos (2 zinco e 1 magnésio) necessários para sua atividade enzimática e sua atividade ótima têm sido identificada em pH alcalino, variando entre 8 e 11 (Millán, 2006; Yegutkin, 2008). Elas apresentam ampla especificidade por inúmeros substratos como compostos fosfomonoéster e outros compostos fosfatados, incluindo nucleotídeos da adenina, pirofosfato, polifosfatos inorgânicos, glicose-6-fosfato,  $\beta$ -glicerofosfato, bis-(p-nitrofenil)-fosfato (Zimmermann *et al.*, 2012) (Tabela 1). As APs apresentam 3 isoenzimas com homologia entre si de 90 a 98%, sendo distintas entre si por sua localização tecidual: AP intestinal (IAP),

placentária (PLAP) e de células germinativas (GCAP). Uma quarta enzima é identificada por pertencer a este grupo, a fosfatase alcalina tecido não-específica (TNAP), a qual apresenta uma homologia de 50% em relação às demais (Millán, 2006). Ela é abundantemente expressa nos ossos, fígado, rins e em menores níveis, em outros tecidos. A principal função atribuída a esta enzima é a participação nos processos de mineralização óssea, controlando níveis extracelulares de pirofosfato inorgânico (PPi), o qual é um inibidor natural da deste processo (Millán, 2006; Yegutkin, 2008).

#### *1.2.3.3 Ecto-5'-nucleotidase/CD73 e Adenosina deaminase*

Ecto-5'-nucleotidase é também conhecida como CD73 por ter sido inicialmente descoberta como uma proteína de superfície de membrana, e representa hoje, dentre inúmeras outras funções, um marcador de maturação para ambos, linfócitos B e T (Zimmermann, 2000). Esta enzima catalisa a reação de hidrólise de nucleotídeos monofostato em seus respectivos nucleosídeos e Pi. Por esta razão, a ecto-5'NT/CD73 é a principal responsável pela produção de adenosina extracelular a partir de nucleotídeos da adenina (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008; Zimmermann *et al.*, 2012). Sua estrutura é dimérica com peso molecular de aproximadamente 70 KDa. Apresenta-se ligada à membrana plasmática das células por uma interação entre sua porção C-terminal e uma âncora de GPI (Figura 4). À sua estrutura N-terminal encontra-se ligado um átomo de zinco, o qual é imprescindível para sua atividade enzimática, concedendo-lhe assim uma característica de

**Tabela 1-** Resumo das principais características atribuídas aos membros pertencentes à família das ectonucleotidasas.

Nome da Família	Nome da Proteína	Nome do Gene	Principais substratos	Afinidade ao substrato ( $K_m$ ) $\mu$ M	Preferência por substrato
<i>Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase</i>	NTPDase 1	<i>ENTPD 1</i>	NTP, NDP	ATP ~10-200	ATP:ADP (1 a 1,5:1)
	NTPDase 2	<i>ENTPD 2</i>	NTP (NDP)	ATP ~70	ATP:ADP (10 a 40:1)
	NTPDase 3	<i>ENTPD 3</i>	NTP, NDP	ATP ~75	ATP:ADP (3 a 4:1)
	NTPDase 4	<i>ENTPD 4</i>	NTP, NDP (pouco ATP e ADP)	UDP, GDP ~200-500	UDP
	NTPDase 5	<i>ENTPD 5</i>	UDP, GDP, CDP, ADP (pouco ATP)	GDP ~130	UDP
	NTPDase 6	<i>ENTPD 6</i>	GDP, IDP, UDP, CDP (exceto ATP)	n.d.	GDP
	NTPDase 7	<i>ENTPD 7</i>	UTP, GTP, CTP (exceto ATP)	n.d.	UTP
	NTPDase 8	<i>ENTPD 8</i>	NTP (NDP)	ATP 81-226	ATP:ADP (2:1)
<i>Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase</i>	NPP1	<i>ENPP1</i>	<i>NPP1 a NPP3</i> : NTP, NDP, Dinucleoside Polyphosphates, $NAD^+$	n.d.	n.d.
	NPP2	<i>ENPP2</i>			
	NPP3	<i>ENPP3</i>			
<i>Fosfatase Alcalina</i>	TNAP	<i>ALPL</i>	<i>Sustratos comuns</i> : NTP, NDP, NMP, PPi, dentre outros	Low ATP ~ 40	n.d.
	PLAP	<i>ALPP</i>			
	GCAP	<i>ALPP2</i>			
	IAP	<i>ALPI</i>			
<i>Ecto-5'-Nucleotidase/CD73</i>	eN, CD73, ecto-5'NT	<i>5NTE (ENT5)</i>	NMP	AMP 1-50	AMP
<i>Adenosina deaminase</i>	ADA	<i>ADA</i>	Adenosina	-	-

*NTP* (nucleotídeos trifosfato), *NDP* (nucleotídeos difosfato), *NMP* (nucleotídeos monofosfato), n.d. (não definido)

(Adaptado de Yegutkin, 2008; Zimmermann *et al.*, 2012).

metaloenzima (Sträter, 2006). A ecto-5'NT/CD73 é encontrada em diferentes tecidos sendo intensamente expressa no cólon, rins, cérebro, fígado, coração e pulmão (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008). Outras funções não enzimáticas têm sido atribuídas a esta molécula, como a indução da sinalização intracelular e a mediação da adesão célula-célula e célula-matriz (Yegutkin, 2008; Cappellari *et al.*, 2011).

Mesmo não sendo classificada como uma ectonucleotidase, a enzima ADA apresenta importante participação na via de sinalização purinérgica extracelular. Ela catalisa a reação final de hidrólise de nucleotídeos da adenina, convertendo irreversivelmente a adenosina em inosina e assim regulando a ação deste nucleosídeo sobre os receptores P1, agindo em contrapartida a ecto-5'NT/CD73. Esta enzima é amplamente expressa no intestino, timo, pâncreas e outros tecidos linfoides e não linfoides (Yegutkin, 2008).

### **1.3 Sistema Purinérgico e Câncer**

Existem inúmeros fatores associados com a progressão de tumores. Dentre eles, destacamos o sistema purinérgico, o qual pode estar envolvido com o desenvolvimento tumoral de vários tipos de cânceres como o de mama, de bexiga, melanoma, carcinoma epitelial intestinal, gliomas, dentre outros (Spychala, 2000; White *et al.*, 2005; Morrone *et al.*, 2005; Stella *et al.*, 2010). Em modelo animal de câncer de cólon, injeções intraperitoniais de ATP favoreceram a redução do crescimento tumoral (Rapaport, 1990), assim como em estudos *in vitro* com linhagens celulares de diferentes tumores onde o tratamento com ATP reduziu a proliferação celular, desencadeando tanto apoptose como necrose (White & Burnstock, 2006; Tamajusuko *et al.*, 2010). Já estudos realizados com linhagens celulares de glioma,

demonstraram que o uso de doses farmacológicas de ATP (acima de 1 mM), favoreceram a proliferação celular, beneficiando assim a progressão deste tipo de tumor (Morrone *et al.*, 2003; Morrone *et al.*, 2005). Estes resultados, tantas vezes surpreendentes, podem estar relacionados com o diferente perfil de receptores purinérgicos expresso pelas células tumorais, os quais podem desencadear efeitos antagônicos de acordo com a concentração de ATP à qual são expostos (White & Burnstock, 2006).

Os receptores purinérgicos mais envolvidos com a biologia de tumores são os ionotrópicos P2X<sub>5</sub> e P2X<sub>7</sub> e os metabotrópicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>11</sub>. Os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> são evidenciados por seu envolvimento com processos proliferativos de células tumorais, os P2X<sub>5</sub> e P2Y<sub>11</sub> foram associados a processos de diferenciação celular com subsequente inibição da proliferação e o receptor P2X<sub>7</sub> tem sido associado com eventos de regulação tanto de morte quanto de proliferação tumoral (White & Burnstock, 2006; Tamajusuku *et al.*, 2010; Ryu *et al.*, 2011; Gehring *et al.*, 2012). Dentre estes, o que tem recebido mais atenção no âmbito das pesquisas terapêuticas relacionadas ao câncer é o receptor P2X<sub>7</sub> devido a sua íntima relação com eventos de morte celular quando estimulado por ATP, constituindo assim, um efetivo alvo para tratamentos (Tamajusuko *et al.*, 2010). No entanto, como mencionado acima, efeitos antagônicos podem ser mediados. No caso do P2X<sub>7</sub>, ele também pode favorecer o crescimento tumoral ao estimular a proliferação. Tudo irá depender do tipo celular e das concentrações de ATP às quais este receptor é exposto, assim como o período pelo qual ele permanece sob ativação (Di Virgilio *et al.*, 2009).

Como observado em outros sistemas biológicos, é de forma bastante orquestrada que se dá participação das ectonucleotidases no desenvolvimento tumoral. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que diferentes linhagens celulares de glioma e câncer de

bexiga, quando comparadas com células normais ou com linhagens de menor grau de malignidade, apresentaram uma inversão da expressão e atividade das NTPDases e ecto-5'NT/CD73, com conseqüente redução da atividade ATPásica e aumento da atividade AMPásica (Wink *et al.*, 2003; Stella *et al.*, 2010). Outro trabalho demonstrou que ratos com tumores cerebrais induzidos, que tiveram a enzima apirase (NTPDase1) co-injetada com as células indutoras do tumor, apresentaram uma redução significativa no tamanho e malignidade do tumor implantado em relação aos grupos controle, apontando assim para o envolvimento do ATP extracelular no crescimento dos glioblastomas *in vivo* (Morrone *et al.*, 2006). Por outro lado, quando a enzima NTPDase 2 foi superexpressa na linhagem celular de glioma C6 e essas células foram implantadas no cérebro de ratos, observou-se a formação de tumores maiores e mais agressivos quando comparados com os tumores dos animais controle. Isso demonstra que alterações não apenas nas concentrações de ATP, mas também de seus subprodutos, como por exemplo o ADP, podem alterar a biologia desses tumores e influenciar o seu desenvolvimento (Braganhof *et al.*, 2009).

A adenosina, um dos produtos da cascata hidrolítica do ATP no meio extracelular, também tem demonstrado um importante papel nos estudos sobre o câncer. Dentre estes efeitos listam-se a proteção contra isquemia, estimulação do crescimento e angiogênese, além da supressão da resposta imune contra as células tumorais (Spsychala, 2000). Conseqüentemente, como principal produtora deste nucleosídeo no meio extracelular, destacamos a ecto-5'NT/CD73 na progressão tumoral. Bavaresco *et al.* (2008), mostraram que com o aumento na confluência das linhagens de células de glioma humano U138 e de rato C6, houve um aumento da expressão e atividade da ecto-5'NT/CD73, o que está em acordo com demais resultados que sugerem um importante papel para esta molécula na progressão e invasividade de células tumorais, não

apenas como produtora de adenosina, mas também como uma molécula de membrana. Sadej *et al* (2006) em um trabalho com células de melanoma com diferentes graus de malignidade, mostraram que quanto maior o grau do tumor, mais intensa era a expressão da ecto-5'NT/CD73. Adicionalmente, a inibição da atividade desta enzima tanto por seu inibidor específico quanto por moléculas da matriz extracelular, promoveu alterações no processo de adesão celular na linhagem de células de glioma humano U138MG, confirmando a participação da ecto-5'NT/CD73 em processos de invasividade tumoral (Cappellari *et al.*, 2011).

Diante de dados tão contundentes, nosso grupo de pesquisa tem sugerido uma “hipótese purinérgica” a qual tem sido alvo de nossos estudos para avaliar o envolvimento deste sistema na progressão de tumores, em especial, do sistema nervoso central e de bexiga (Braganhol *et al.*, 2013). De acordo com essa hipótese, níveis elevados de ATP no meio extracelular favoreceriam o crescimento e a proliferação das células tumorais, mediados pela ativação de respectivos receptores P2. No intuito de auto-proteção, as células normais adjacentes, que expressam as enzimas necessárias, degradariam este ATP em seus subprodutos tentando evitar os efeitos citotóxicos ocasionados ao tecido normal por concentrações extracelulares exacerbadas deste nucleotídeo. O decorrente acúmulo de AMP serviria então de substrato para a ecto-5'NT/CD73, a qual é superexpressa por inúmeros tipos de tumores, produzindo elevadas concentrações de adenosina extracelular que propiciariam o crescimento da massa tumoral (Morrone *et al.*, 2006; Stella *et al.*, 2010; Braganhol *et al.*, 2013).

Sendo assim, tendo em vista os inúmeros fatores que confirmam a participação dos componentes do sistema purinérgico na biologia de diferentes tipos de tumores, destacando os contundentes dados apresentados por nosso grupo de pesquisa, a ideia fundamental desta tese de doutorado visa dar continuidade e aprofundar ainda mais os estudos na progressão de tumores do

sistema nervoso central, avaliando tanto *in vitro* como *in vivo*, uma possível relação entre o sistema purinérgico e os meduloblastomas.

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Caracterizar a expressão dos receptores e enzimas do sistema purinérgico e investigar o envolvimento destes no metabolismo extracelular do ATP, bem como de seus subsequentes metabólitos, em diferentes linhagens celulares de meduloblastoma e em um modelo *in vivo* desses tumores.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar a expressão e funcionalidade dos Receptores Purinérgicos e determinar a participação dos mesmos na progressão e morte dos meduloblastomas (Item 3.1);
- Caracterizar a expressão e atividade das Enzimas do Sistema purinérgico, bem como sua participação no metabolismo extracelular dos nucleotídeos e o possível envolvimento destas com a biologia dos meduloblastomas (Item 3.2);
- Analisar o efeito da restituição da enzima ecto-5`NT/CD73 na linhagem celular de meduloblastoma humano D283 e determinar seu possível papel no processo de progressão tumoral *in vitro* e *in vivo* (Item 3.3).

## **3. RESULTADOS**

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 Artigo 1**

#### **P2X<sub>7</sub> RECEPTOR AS A POTENTIAL TARGET TO INDUCE CELL DEATH IN MEDULLOBLASTOMA CELL LINES**

Angélica Regina Cappellari; Vanessa Clarimundo; Talita Glaser; Fabrícia Dietrich; Franciane Brackmann Mendes; Claudiana Lameu; Ana Lúcia Abujamra; Rafael Roesler; Henning Ulrich; Ana Maria Oliveira Battastini

Periódico: **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**

**Manuscrito a ser submetido para publicação**

### **3.2 Artigo 2**

**CHARACTERIZATION OF ECTONUCLEOTIDASES IN HUMAN  
MEDULLOBLASTOMA CELL LINES: *ecto-5'NT/CD73* IN AS A POTENTIAL  
PROGNOSTIC FACTOR**

Angélica Regina Cappellari, Liliana Rockenbach, Fabrícia Dietrich, Vanessa Clarimundo, Talita Glaser, Elizandra Braganhol, Ana Lúcia Abujamra, Rafael Roesler, Henning Ulrich and Ana Maria Oliveira Battastini.

Periódico: **PLOS ONE**

**Publicado**

### **3.3 Artigo 3**

## **ECTO-5'NT/CD73 OVEREXPRESSION REDUCES THE TUMOR GROWTH IN XENOGRAPH MEDULLOBLASTOMA MODEL BY INDUCE ACTIVATION OF A<sub>2A</sub> ADENOSINE RECEPTOR**

Angélica Regina Cappellari; Micheli Mainardi Pillat; Hellio Danny Nóbrega de Souza; Liliana Hockenbach; Elizandra Braganhol, Francine Hehn de Oliveira; Ana Lúcia Abujamra; Rafael Roesler; Jean Sévigny; Henning Ulrich; Ana Maria Oliveira Battastini

Periódico: **Cancer Letters**

**Manuscrito a ser submetido para publicação**

## **4. DISCUSSÃO**

## 4 DISCUSSÃO

Meduloblastomas (MB) são tumores neuroepiteliais cerebrais altamente agressivos que ocorrem preferencialmente no cerebelo e afetam crianças com idade média de aproximadamente nove anos (Gilbertson & Ellison, 2008; Smoll & Drummond, 2012). Além disso, a grande problemática desta malignidade está nas dificuldades do tratamento, onde a principal ferramenta é a ressecção cirúrgica da massa tumoral, seguida de radioterapia e em alguns casos, aplica-se quimioterapia como um adjuvante, as quais proporcionam ao paciente uma média de sobrevida de aproximadamente cinco anos (Brandes & Paris, 2004; Schmidt *et al.*, 2010; Massimino *et al.*, 2011). No entanto, isso acaba por gerar lesões que podem retardar a resposta do paciente ao tratamento e causar danos que afetam seu desenvolvimento e qualidade de vida futura. Uma tentativa em contornar este viés tem sido a avaliação de marcadores que permitam a classificação do tumor e a aplicação de um tratamento mais adequado e específico, proporcionando uma sobrevida de melhor qualidade ao paciente. Dentre estes marcadores, destacam-se alterações cromossômicas como mutações no cromossomo 17 assim como amplificações nos genes MYCC e MYCN (Brandes & Paris, 2004; Huse & Holland, 2010). Adicionalmente, têm-se avaliado alterações em vias de sinalização como SHH, Wnt e Notch que têm sido evidenciadas não apenas por estarem envolvidas com a tumorigênese dos MB, mas também por auxiliarem na classificação do tumor, predizendo, em parte, o comportamento biológico desta malignidade (Schmidt *et al.*, 2010; Massimino *et al.*, 2011).

Um sistema que tem sido cada vez mais investigado a cerca de sua participação no processo de malignidade e progressão tumoral é o Sistema Purinérgico (Spychala, 2000; White *et al.*, 2005; Beavis *et al.*, 2012). Não apenas o ATP, mas também outros nucleotídeos e nucleosídeos, ao desempenharem suas funções via receptores P2, podem favorecer a proliferação

tumoral ao ativar vias intracelulares relacionadas com este processo, assim como induzir a secreção de inúmeros fatores que também atuam como adjuvantes na progressão tumoral, muitas vezes por regularem fatores externos, como por exemplo, a resposta imune que atua sobre o tumor (Morrone *et al.*, 2003; Morrone *et al.*, 2005; Braganhol *et al.*, 2009; Adinolfi *et al.*, 2012). Por outro lado, a modulação deste sistema quer pela ação das ectonucleotidases, que regulam os níveis dos nucleotídeos no meio extracelular, quer pela ação de drogas, pode caracterizar novas possíveis ferramentas para o controle e tratamento do câncer (Morrone *et al.*, 2006; Braganhol *et al.*, 2009). Diante dos fatos, o principal objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa, tem sido evidenciar a participação do sistema purinérgico em gliomas assim como em câncer de bexiga. No intuito de aprofundar ainda mais nossas investigações, esta tese de doutorado teve por objetivo principal avaliar o sistema purinérgico em diferentes linhagens de MB humano, enfatizando a continuidade nos estudos sobre a inter-relação entre o sistema purinérgico e sua participação na progressão de tumores do sistema nervoso central.

O primeiro passo dado a fim de cumprir nossas metas, foi caracterizar a expressão e funcionalidade dos receptores purinérgicos P2 (item 3.1). Como ferramenta de estudo, utilizamos as já mencionadas linhagens celulares de MB humano Daoy e ONS76, representativas de tumores primários, e a linhagem D283, representativa de um foco metastático. Avaliamos inicialmente através da técnica de Real Time PCR, a expressão do mRNA de todos os receptores purinérgicos P2X e P2Y até então descritos (Figura 1 e Tabela 2 do item 3.1). Observamos que a linhagem D283 expressa todos os receptores P2X, com uma expressão mais contundente dos receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> e P2X<sub>4</sub>. Já para as outras linhagens celulares avaliadas observamos um perfil de expressão bem menos evidente, destacando a moderada expressão dos receptores P2X<sub>3</sub> e P2X<sub>5</sub> pela Daoy e do receptor P2X<sub>2</sub> pela ONS76. Adicionalmente, observamos que estas

linhagens apresentaram um perfil específico de expressão do receptor P2X<sub>7</sub> assumindo as seguintes proporções: Daoy > D283 >> ONS76, sendo que a expressão pela linhagem ONS76 foi considerada ausente. Juntamente, a estes dados, observamos que os receptores P2Y foram expressos de forma ubíqua entre as linhagens variando apenas a intensidade de expressão de cada um deles.

Uma ampla gama de funções fisiológicas e patológicas é atribuída especificamente a cada membro desta família de receptores (Burnstock, 2008) sendo que o receptor P2X<sub>7</sub> é o que tem recebido mais atenção no que diz respeito aos estudos sobre o câncer, seguido pelos receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> (Di Virgilio *et al.*, 2009). Ao analisarmos a expressão proteica destes três receptores nas linhagens celulares de MB, evidenciamos o mesmo perfil identificado na análise anterior, onde a Daoy confirmou a maior expressão do P2X<sub>7</sub> em comparação com as demais linhagens e a D283 confirmou a proeminente expressão dos receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> (Figura 2, item 3.1).

Na sequência, a fim de avaliar a funcionalidade destes receptores, evidenciamos o perfil de influxo de Ca<sup>2+</sup> apresentado por estas células após terem sido estimuladas pelo ATP, assim como a modulação da atividade destes receptores por agonistas e antagonistas (Figura 3, item 3.1). Os resultados obtidos nos mostraram que a linhagem Daoy, que apresentou a maior expressão do receptor P2X<sub>7</sub>, apresentou um aumento no influxo de Ca<sup>2+</sup> de acordo com o aumento da concentração de ATP à qual ela foi exposta. Quando estimulada pelo BZ-ATP, um agonista específico do receptor P2X<sub>7</sub>, os níveis de influxo de Ca<sup>2+</sup> foram semelhantes aos alcançados sob o estímulo com ATP. Isso nos permite atribuir este efeito à funcionalidade do receptor P2X<sub>7</sub>, tendo visto que a caracterização deste receptor aponta que são necessários níveis mais elevados de ATP para que ocorra a ativação do mesmo (Coddou *et al.*, 2011). A linhagem

D283 apresentou um maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em todas as concentrações de ATP à qual foi exposta, quando comparada com a Daoy. Este evento provavelmente se deve a vasta expressão dos receptores P2X por essa linhagem. Curiosamente, observamos que a D283 demonstrou um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mais elevado quando exposta às menores concentrações de ATP. Como mencionado anteriormente, esta linhagem mostrou uma proeminente expressão dos receptores P2X<sub>1</sub> e P2X<sub>4</sub>, os quais são descritos por serem ativados pelo ATP em concentrações que variam em até no máximo 10  $\mu\text{M}$  (Coddou *et al.*, 2011). Sendo assim, sugerimos que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  demonstrado pela D283 possa ser atribuído à ativação destes receptores. Este perfil de expressão e atividade dos receptores P2X apresentados pela linhagem D283, com exceção do P2X<sub>7</sub>, também foi identificado em células neurais com fenótipo indiferenciado (Resende *et al.*, 2007). Tal comportamento também pode ser atribuído a células tumorais metastáticas, assim como a D283, que apresentam alto grau de indiferenciação, o qual acaba por lhes conferir maior grau de malignidade (Dirks, 2010). Adicionalmente, observamos que a linhagem D283 quando exposta a 100  $\mu\text{M}$  de ATP, apresentou uma diminuição no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  quando comparado com as menores concentrações, e ainda, quando estimulada por BZ-ATP, demonstrou um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ainda menor, o que nos permite atribuir este comportamento, à reduzida expressão do receptor P2X<sub>7</sub> apresentada pela D283.

O receptor P2X<sub>7</sub>, quando ativado por concentrações em torno de 100  $\mu\text{M}$ , promove a abertura de canais catiônicos na membrana celular. No entanto, quando submetido a um estímulo continuado com concentrações de ATP que atingem a faixa de milimolar, este receptor acaba por formar poros que apresentam alta permeabilidade a moléculas com aproximadamente 900 Da (Coddou *et al.*, 2011). É bem estabelecido na literatura que concentrações farmacológicas de ATP (acima de 1 mM), podem gerar um influxo incontrolado de  $\text{Ca}^{2+}$  e desencadear a ativação de vias

de sinalização intracelulares envolvidas nos processos de morte por apoptose e/ou necrose. Tal processo caracteriza o efeito de citotoxicidade gerado pelo ATP, o qual é descrito em inúmeros eventos patológicos que incluem, por exemplo, doenças neurodegenerativas (Burnstock, 2006a; Burnstock, 2008; Coddou *et al*, 2011).

Partindo deste ponto de vista, avaliamos o efeito do tratamento com elevadas concentrações de ATP nas linhagens celulares de MB humano (Figuras 4-6, item 3.1). Observamos inicialmente que houve uma redução no número de células e na viabilidade, em todas as linhagens. Com base nesse resultado, a fim de avaliarmos se esse efeito era devido à indução de morte celular, avaliamos a incorporação de iodeto de propídio pelas células após o tratamento com ATP 2 e 5 mM, juntamente com moduladores do receptor P2X<sub>7</sub>, por 24h. A linhagem ONS76 apresentou morte celular quando tratada com ATP, no entanto, este efeito não foi alterado com a modulação do receptor do P2X<sub>7</sub>. Esta linhagem apresentou a expressão do receptor P2X<sub>2</sub>, no entanto, em humanos este receptor fora descrito com um EC<sub>50</sub> de aproximadamente 1 μM (Coddou *et al*, 2011). Sendo assim, diante das condições utilizadas, sugerimos que não há participação deste receptor nos efeitos obtidos nessa célula. Nucleotídeos, nucleosídeos assim como outras moléculas, quando em elevadas concentrações no meio extracelular, dependendo do tipo de célula, podem provocar a morte por alteração da osmolaridade do meio (Wu *et al.*, 2006). A linhagem D283, mesmo tendo apresentado redução do número de células e também da viabilidade celular sob tratamento com ATP, não apresentou indícios de morte celular. É descrito que o receptor P2X<sub>7</sub>, para a formação do poro na membrana, necessita de proteínas adicionais denominadas panexinas (Abbracchio *et al.*, 2009; Coddou *et al.*, 2011). Mutações neste receptor ou a ausência das panexinas impedem a formação do poro e assim contribuem para a redução da morte celular promovida pelo continuado estímulo do P2X<sub>7</sub>

(Adinolfi *et al*, 2005). Adicionalmente, a linhagem D283 apresentou uma elevada expressão do receptor P2Y<sub>2</sub>, o qual é descrito por apresentar um papel neuroprotetor em doenças neurodegenerativas (Weisman *et al*, 2012), desta forma prevenindo o efeito citotóxico do ATP sobre estas células.

Diferentemente das demais linhagens celulares, a Daoy apresentou morte celular sob tratamento com ATP e também com BZ-ATP 100 µM, tendo sido este efeito revertido na presença do BBG, um antagonista inespecífico do receptor P2X<sub>7</sub>, sugerindo então que o efeito citotóxico do ATP sobre a linhagem Daoy é mediado por este receptor. O P2X<sub>7</sub> tem sido amplamente descrito como alvo terapêutico para o câncer, tendo visto que sua modulação pode desencadear a morte celular (Tamajusuku *et al.*, 2010; Gehring *et al.*, 2012). No entanto fica a grande pergunta: porque uma célula tumoral, que tende a expressar e produzir moléculas que levam ao estímulo das condições de proliferação expressaria um receptor que quando estimulado a levaria a morte? Existem dados na literatura que mostram que a ativação do receptor P2X<sub>7</sub> pode promover o crescimento tumoral (Ryu *et al.*, 2011; Adinolfi *et al.*, 2012). A rápida e controlada ativação deste receptor gera a formação de ondas de cálcio no meio intracelular, as quais, por sua vez, agem sobre a mitocôndria alterando seu potencial de membrana e, conseqüentemente, interferindo na atividade de enzimas envolvidas com o metabolismo energético das células, estimulando a produção de ATP, favorecendo assim a progressão do tumor (Adinolfi *et al*, 2005). Com isso, podemos inferir que a expressão do P2X<sub>7</sub> pela linhagem Daoy seja útil à sua biologia favorecendo a proliferação, e dessa forma, sugerimos o P2X<sub>7</sub> como um potencial alvo farmacológico contra os MB.

De uma forma geral, os dados apontados no item 3.1 sugerem que as células de MB humano apresentam perfis diferenciados de expressão dos receptores purinérgicos P2 e a

modulação destes pode ser sugerida como alvo farmacológico para o tratamento desta malignidade. Adicionalmente, a fisiologia do sistema purinérgico descreve que as concentrações extracelulares de ATP e sua ação sobre os receptores são controladas pelas ectonucleotidases (Zimmermann *et al.*, 2012). Considerando a alta expressão dos receptores P2 pelas linhagens de MB, o próximo passo deste trabalho, apresentado no item 3.2, foi caracterizar a família das ectonucleotidases nestas linhagens tumorais.

O ATP é liberado para o meio extracelular em condições tanto fisiológicas quanto patológicas promovendo inúmeras funções celulares (Fields & Burnstock, 2006). Neste contexto, tomando por base dados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, que mostraram a secreção de ATP por células de glioma (Braganhol *et al.*, 2007), buscamos analisar o perfil de secreção dos nucleotídeos da adenina pelas linhagens celulares de MB humano. Observamos que as três linhagens, mesmo em diferentes proporções, secretam elevadas concentrações de ATP para o meio extracelular. Em gliomas, o tratamento com concentrações de ATP semelhantes às secretadas pela linhagem Daoy, provocou um aumento significativo da proliferação celular (Morrone *et al.*, 2003) e em culturas organotípicas de hipocampo de rato promoveu citotoxicidade, desencadeando morte celular (Morrone *et al.*, 2005). Isso demonstra que em diferentes situações o ATP pode promover efeitos completamente opostos, resultado da variada expressão dos receptores P2 e também do perfil das enzimas responsáveis pela manutenção da homeostase purinérgica extracelular.

Apresentamos na Figura 2 do item 3.2, a análise qualitativa e quantitativa da expressão das ectonucleotidases nas linhagens celulares de MB humano Daoy, ONS76 e D283. Assim como nos gliomas (Wink *et al.*, 2003b), as linhagens de MB não apresentaram a expressão das NTPDases1,2 e 3, as quais foram caracterizadas como as principais responsáveis pela hidrólise

dos nucleotídeos ATP e ADP no meio extracelular (Robson *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2012) principalmente no sistema nervoso central (Wink *et al.*, 2003a). Sendo assim, a perda da expressão e atividade destas enzimas pode ser parte do processo de transformação maligna de tumores cerebrais. Dentre as enzimas desta subfamília, observamos unicamente a expressão da NTPDase5, que por ser uma enzima intracelular, não participa da regulação dos níveis de nucleotídeos no meio extracelular (Yegutkin, 2008; Zimmermann *et al.*, 2012). No entanto, mesmo sem apresentar relação com o metabolismo purinérgico extracelular de tumores, ela é considerada um protooncogene, e sua expressão pode ser associada com o grau de malignidade de células tumorais (Villar *et al.*, 2007).

Em adição às NTPDases, as NPPs são enzimas com propriedades catalíticas, de certa forma diferenciadas, que também apresentam a capacidade de metabolizar nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular. As linhagens Daoy e ONS76, apresentaram baixa expressão e atividade destas enzimas. Por outro lado, a D283 apresentou um perfil característico de expressão, onde  $NPP2 > NPP1 > NPP3$  e maior atividade enzimática em relação às demais linhagens analisadas sob condições ótimas de catalise. Todos esses resultados nos permitem sugerir que as NPPs fazem parte do controle do metabolismo extracelular dos nucleotídeos tri- e difosfatados nas linhagens de MB humano, especialmente na linhagem D283.

A enzima NPP3 tem sido relatada por ser expressa preferencialmente por células que apresentam um maior grau de indiferenciação, como por exemplo, em astrócitos imaturos de ratos no período pré e pós-natal (Braganhol *et al.*, 2007). Mesmo tendo apresentado um menor nível de expressão da NPP3 em relação às demais enzimas desta subfamília, a D283 foi a linhagem que mais expressou esta enzima entre as demais linhagens de MB analisadas e mais uma vez é conferida a ela a relação com a expressão de fatores relacionados a um maior grau de

indiferenciação, como o que é aferido a células metastáticas e sabidamente mais agressivas. A NPP1 também foi sugerida como um marcador de malignidade por ser expressa em células de glioma de rato C6 (Grobber *et al.*, 1999), no entanto, não foi atribuída a ela qualquer relação com processos de diferenciação celular. A NPP2 por sua vez tem sido relacionada com inúmeras outras funções como a promoção da angiogênese, proliferação e diferenciação celular além de favorecer a motilidade de células de melanoma e também de câncer de mama. Adicionalmente, a alta expressão da NPP2 em amostras de câncer de pulmão foi relacionada com o grau de crescimento e invasividade (Goding *et al.*, 2003; Stefan *et al.*, 2005). Estes dados, associados com os elevados níveis de expressão desta enzima encontrados na linhagem D283, nos permitem sugerir que a NPP2 esteja associada com o perfil metastático desta linhagem.

Como já discutido anteriormente as três linhagens de MB humano aqui estudadas, apresentaram baixa atividade ATPásica e ADPásica e um diferente perfil de hidrólise AMPásica onde a linhagem Daoy apresentou a maior capacidade catalítica. Diante deste dado, resolvemos avaliar o perfil de hidrólise do AMP por estas linhagens, assim como a formação dos subprodutos a partir deste nucleosídeo. Observamos que as linhagens Daoy e ONS76 apresentaram a capacidade de hidrolisar o AMP de forma bastante eficiente, no entanto, elas diferiram entre si quando analisamos os subprodutos formados. Na linhagem Daoy o AMP foi eficientemente hidrolisado e houve o acúmulo de adenosina. Na ONS76 o AMP também foi hidrolisado, mas com posterior acúmulo de inosina. Este dado à cerca da ONS76 está de acordo com a proeminente expressão da enzima adenosina deaminase (ADA) apresentada por esta linhagem, a qual catalisa a conversão de adenosina em inosina no meio extracelular (Yegutkin, 2008).

Em adição, demonstramos que a capacidade de hidrólise do AMP mostrada pelas linhagens de MB foi a mesma frente a outros nucleosídeos monofosfatados. Uma importante subfamília de enzimas é descrita por auxiliar na hidrólise de nucleosídeos monofosfatados no meio extracelular, as fosfatases alcalinas (AP) (Millán, 2006). Ao realizarmos a incubação enzimática com substratos específicos para esta enzima, observamos que a mesma hidrolisou apenas o pirofosfato inorgânico (PPi). Sendo assim, para avaliar se esta enzima participava na hidrólise do AMP, testamos a hidrólise deste nucleosídeo na presença de levamisol, um inibidor específico para AP. Observamos que este não alterou a capacidade de hidrólise do AMP pelas linhagens de MB, nos levando a descartar a participação atividade da AP em nossas condições experimentais.

A ecto-5'NT/CD73 é descrita como a principal responsável pela hidrólise extracelular de nucleosídeos monofosfatados (Strater, 2006; Yegutkin, 2008; Zimmermann *et al.*, 2012). Neste trabalho, mostramos que os MB estudados demonstraram uma característica expressão do mRNA, acompanhada pela expressão proteica da ecto-5'NT/CD73 seguindo um perfil onde a Daoy > ONS76 > D283. Este perfil foi confirmado pela análise dos demais resultados acerca da capacidade destas células em hidrolisar o AMP e também outros nucleotídeos monofosfatados. Com base nos dados da literatura, apontamos o resultado da expressão da ecto-5'NT/CD73, como um dado bastante intrigante, isso porque esta enzima tem sido amplamente descrita por seu íntimo papel na progressão de diferentes tipos de tumores (Beavis *et al.*, 2012), assim como tem sido também relacionada com aumento da malignidade tumoral (Sadej *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012). Para os MB, observamos que as linhagens primárias apresentaram a expressão da ecto-5'NT/CD73 e a linhagem D283, derivada de uma metástase e conseqüentemente mais maligna, não expressa esta enzima. Adicionalmente, em uma ordem inversa à expressão da ecto-

5'NT/CD73, estas linhagens expressaram a enzima adenosina deaminase nos permitindo sugerir que as modulações extracelulares nos níveis de adenosina podem ser cruciais também para a regulação da progressão deste tipo de tumor.

Sabe-se que a expressão da ecto-5'NT/CD73 e da adenosina deaminase é regulada pela via canônica da Wnt/ $\beta$ -catenina, a qual age ativando e inibindo a expressão destas enzimas, respectivamente (Spychala and Kitajewski, 2004). Esta via, por sua vez, tem sido descrita por induzir a transdução de inúmeros genes favoráveis ao câncer, inclusive em alguns subtipos de MB (Gilbertson & Ellison, 2008). De forma bastante sucinta, esta via baseia-se na regulação dos níveis citosólicos de  $\beta$ -catenina. Quando ela encontra-se inibida, a enzima GSK3- $\beta$  promove a fosforilação da  $\beta$ -catenina destinando-a a ubiquitinação e posterior degradação. Quando a via Wnt está ativada, ela impede a fosforilação da  $\beta$ -catenina, favorecendo o aumento de seus níveis no citosol. Quando isso acontece, esta proteína sofre translocação para o núcleo, onde ela se une com outras proteínas nucleares formando complexos promotores específicos que ativam ou inibem a transcrição de genes dependentes da via Wnt/ $\beta$ -catenina (Polaskis, 2000; Ellison *et al.*, 2005). Dados evidenciados em biópsias de MB mostraram que a imunoreatividade citoplasmática para  $\beta$ -catenina estava associada com um prognóstico ruim para os pacientes e que a imunoreatividade nuclear estava associada com um bom prognóstico (Ellison *et al.*, 2005). Sendo assim, buscamos avaliar o perfil de imunoreatividade para a  $\beta$ -catenina nas linhagens de MB humano aqui estudadas. Observamos que as linhagens Daoy e ONS76 apresentaram maior reatividade nuclear para a  $\beta$ -catenina do que a D283, que expressa essa proteína preferencialmente no citosol. Tendo visto que a  $\beta$ -catenina quando no núcleo, modula a transcrição de inúmeros genes alvo, podemos atribuir que o perfil de expressão da ecto-5'NT/CD73 e da adenosina deaminase, evidenciado nas linhagens de MB humano aqui

estudadas, seja oriundo da regulação gênica da via Wnt/ $\beta$ -catenina. Em adição, a imunoreatividade para  $\beta$ -catenina tem sido associada com a determinação do prognóstico para os pacientes, sugerimos que a expressão da ecto-5'NT/CD73 seja incluída no rol de marcadores úteis na determinação do prognóstico para pacientes com MB.

Considerando os importantes dados apresentados no item 3.2, os quais sugerem a expressão da enzima ecto-5'NT/CD73 como um bom marcador para prognóstico em MB humano e o importante papel que tem sido atribuído a esta enzima na progressão de diferentes tipos de tumores (Beavis *et al.*, 2012), a continuidade deste trabalho foi avaliar o efeito da superexpressão da ecto-5'NT/CD73 na linhagem de MB humano D283 e avaliar o seu papel sobre a formação e crescimento do tumor em um modelo *in vivo* de implante tumoral xenográfico.

Os dados descritos no item 3.3 mostram inicialmente a caracterização do processo de transfecção celular onde avaliamos a eficiência do mesmo na superexpressão da enzima ecto-5'NT/CD73 na linhagem D283 (Figura 1, item 3.3). Foi possível observar que a linhagem que recebera a sequência gênica para esta enzima, D283hCD73 demonstrou expressar tanto o mRNA que a codifica quanto a proteína e atividade em sua membrana plasmática, sendo que o controle da transfecção, descrito como a linhagem D283ev, mostrou baixos níveis de proteína e ausência de atividade. Na sequência, realizamos então o implante subcutâneo destas linhagens em um modelo *in vivo*, incluindo a linhagem Daoy como um controle positivo da expressão da ecto-5'NT/CD73. Durante o acompanhamento do crescimento do tumor, medidas sequenciais eram obtidas do maior e menor diâmetro da massa tumoral para determinação do volume do tumor assim como medidas do peso do animal eram obtidas a fim de monitorarmos sua integridade fisiológica. Como apontado na Figura 2 do item 3.3, os tumores produzidos quando os animais

foram implantados com a linhagem que superexpressava da ecto-5'NT/CD73 mostraram um volume de crescimento menor quando comparado aos tumores implantados com a linhagem D283ev, o controle negativo para a expressão desta enzima. Adicionalmente a linhagem Daoy, durante o mesmo período de crescimento, produziu um tumor de proporções significativamente menores e com menores características de malignidade.

Foi estabelecido que os animais fossem eutanasiados quando o primeiro de cada grupo demonstrasse um tumor cuja medida do maior diâmetro atingisse proporções próximas a 18 mm. Ao término de cada período experimental, os animais eram eutanasiados, os tumores excisados e fixados para posteriores análises. Foi possível observar, com base na medida final do tamanho do tumor que a linhagem D283hCD73 gerou um tumor de menor proporção, tanto em dimensões quanto em peso, quando comparada com o controle D283ev, sugerindo que o reestabelecimento da expressão desta enzima gerou um tumor cujo comportamento foi similar ao tumor gerado pela linhagem Daoy, que naturalmente expressa essa proteína. Gostaríamos de deixar claro que a linhagem tumoral que apresenta a expressão desta enzima também possui a capacidade de formação de um tumor maligno, no entanto, podemos sugerir que o fato deste tumor gerado apresentar um crescimento mais lento, o tornaria suscetível a um tratamento mais rigoroso e eficiente. Com base nesta combinação de resultados podemos sugerir que a expressão da ecto-5'NT/CD73 por MB, pode estar relacionada a uma maior taxa de sobrevida, indicando um melhor prognóstico. Este dado tende a corroborar com a hipótese sugerida no item 3.2, que atribui um prognóstico favorável ao MB que expressa a ecto-5'NT/CD73 assim como com dados da literatura que atribuem este mesmo perfil às amostras de pacientes com carcinoma de mama que expressam esta enzima (Supernat *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente, a principal função da ecto-5'NT/CD73 no ambiente tumoral é a produção extracelular de adenosina (Zhang, 2011). Esta, por sua vez, tem sido amplamente descrita por favorecer o crescimento tumoral ativando vias de proliferação, estimulando a angiogênese assim como protegendo o tecido tumoral contra a resposta imune (Spychala, 2000; Beavis *et al.*, 2012) principalmente pela ativação de seus receptores específicos P1 (Fredholm *et al.*, 2001; Ham & Evans, 2012). Sendo assim, muitas vezes os efeitos contraditórios observados durante a modulação da ecto-5'NT/CD73 podem ser atribuídos ao perfil de expressão destes receptores demonstrado pela célula em questão (Yasuda *et al.*, 2009). Fundamentados nesta ideia, buscamos avaliar a expressão dos receptores P1 nas linhagens de MB humano Daoy e D283. Observamos uma alta expressão do receptor de adenosina A<sub>1</sub> pela Daoy e do receptor A<sub>2A</sub> pela D283 (Figura 6, item 3.3). Assim como nos MB, outras linhagens tumorais foram demonstradas por expressar estes receptores como, por exemplo, a linhagem T24 de câncer de bexiga a qual expressa os receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> (Phelps *et al.*, 2006) e também a linhagem de glioma de rato C6 que apresenta a expressão de todos os receptores P1 (Castillo *et al.*, 2007).

De acordo com dados da literatura, nós sugerimos que a redução do crescimento do tumor implantado atribuída à superexpressão da ecto-5'NT/CD73 na linhagem D283, tenha sido desencadeada pela ativação do receptor de adenosina A<sub>2A</sub> expresso por esta linhagem. Sabe-se que a ativação deste receptor pela adenosina promove a redução da viabilidade celular, além de causar dano mitocondrial e desencadear morte por apoptose em células de câncer de cólon (Yasuda *et al.*, 2009). Adicionalmente, a ativação do A<sub>2A</sub> promoveu morte celular em uma linhagem de melanoma humano em um evento independente da ativação da enzima PKA (proteína cinase A). Os autores deste trabalho sugeriram que este evento se deu por um

mecanismo onde a ativação do A<sub>2A</sub> desencadeou a produção de cAMP via adenilato ciclase, o qual, por sua vez, promoveu a ativação da via da ERK e esta, então, ativou eventos intracelulares relacionados à morte das células (Merighi *et al.*, 2002). Esta via de promoção de morte celular foi descrita também por outros pesquisadores como tendo sido desencadeadas por agentes externos utilizados como tratamento contra o câncer, como o taxol e o resveratrol (Bacus *et al.*, 2001; She *et al.*, 2001).

Por fim, os dados relacionados no item 3.3 em concordância com o item 3.2, apontam a enzima ecto-5'NT/CD73 como possível marcador de prognóstico favorável aos MB. Adicionalmente, aos tumores que não apresentarem sua expressão, vale ressaltar que sua modulação gênica pode vir a constituir um alvo terapêutico. No entanto, essas sugestões devem ser acompanhadas de uma ampla atenção que deve ser direcionada para os receptores P1, mostrando sempre que o estudo em conjunto destes fatores pode vir a constituir ferramentas valiosas para o tratamento dos MB, assim como para outros tipos de tumores.

## **5. CONCLUSÕES**

## 5 CONCLUSÕES

### 5.1 Conclusões gerais

- Componentes do sistema purinérgico, tanto receptores como enzimas, são amplamente expressos por diferentes linhagens de meduloblastoma humano.
- Dentre os receptores purinérgicos P2, destacamos a expressão e funcionalidade do receptor P2X7, onde a modulação do mesmo pode ser sugerida como um eficiente alvo terapêutico para os meduloblastomas.
- O diferenciado perfil de expressão da enzima ecto-5'NT/CD73 pelas linhagens de meduloblastoma humano nos permitem sugerir a mesma como um promissor marcador de prognóstico para esta malignidade. Adicionalmente, sua modulação assim como a dos receptores P1 pode favorecer a redução do crescimento tumoral compondo um eficiente alvo terapêutico no tratamento dos meduloblastomas.

### 5.2 Conclusões específicas

- As linhagens Daoy, ONS76 e D283 apresentam uma variada expressão dos receptores P2X e P2Y, onde destacamos a expressão do receptor P2X7 pela Daoy; o receptor P2X2 pela ONS76 e os receptores P2X1, P2X4, P2Y1 e P2Y2 pela D283.
- A análise da funcionalidade destes receptores quanto à capacidade de favorecer o influxo de cálcio, demonstrou que estes se encontram localizados na membrana destas células e plenamente ativos.

- A modulação do receptor P2X7 na linhagem Daoy por concentrações farmacológicas de ATP promoveu morte celular sugerindo este receptor como um importante alvo terapêutico no tratamento dos meduloblastomas que apresentarem a expressão deste receptor.
- As três linhagens analisadas mostraram secretar ATP para o meio extracelular e também apresentaram ausência da expressão das NTPDases, sugerindo um baixo metabolismo deste nucleotídeo. Sugerimos que este acúmulo do ATP pode favorecer a proliferação das células de meduloblastoma.
- O diferenciado perfil de expressão da enzima ecto-5'NT/CD73 pelas linhagens de MB é regulado pela via canônica Wnt/ $\beta$ -catenina, o que nos permite sugerir que a expressão desta enzima pode ser associada com um bom prognóstico para os meduloblastomas.
- A superexpressão da ecto-5'NT/CD73 na linhagem D283 foi eficiente e a manutenção da nova linhagem superexpressando esta enzima (D283hCD73), se mantida em condições específicas, pode ser utilizada como uma ferramenta no estudo dos efeitos desta enzima e sua modulação por fármacos na progressão dos meduloblastomas.
- O modelo de implante de tumor xenográfico mostrou que a superexpressão da ecto-5'NT/CD73 retardou o crescimento do tumor promovendo uma massa tumoral final de menor tamanho quando comparada com seu controle negativo de expressão da enzima, mostrando que a modulação desta enzima pode ser favorável para o controle do crescimento de meduloblastomas.

- A análise da expressão dos receptores P1 mostrou que a linhagem Daoy expressou o receptor A1 e a linhagem D283 expressou de forma proeminente o receptor A2A.
- Por fim, com base em dados da literatura, sugerimos que o efeito da superexpressão da ecto-5'NT/CD73 ao gerar um tumor menor, foi resultado a modulação do receptor A2A expresso pela linhagem D283, o qual, por sua vez, promoveu uma diminuição da viabilidade das células induzindo as mesmas à morte celular e assim retardando o crescimento do tumor.

## **6. PERSPECTIVAS**

## 6 PERSPECTIVAS

- Avaliar a modulação do receptor P2X<sub>7</sub> sobre a proliferação das linhagens celulares de meduloblastoma humano;
- Identificar o tipo de morte celular desencadeada pela ativação do receptor P2X<sub>7</sub> e possíveis vias intracelulares envolvidas neste processo;
- Avaliar a secreção de citocinas e VEGF após a modulação do receptor P2X<sub>7</sub> e o possível envolvimento destas com a progressão dos meduloblastomas;
- Avaliar o efeito da radioterapia sobre a expressão e atividade do receptor P2X<sub>7</sub> e da enzima ecto-5'NT/CD73, assim como a participação conjunta destes sobre eventos celulares relacionados com a progressão tumoral;
- Avaliar a expressão dos receptores de adenosina nas linhagens celulares transfectadas com a ecto-5'NT/CD73 e determinar seu possível papel sobre eventos de proliferação e invasão tumoral bem como em eventos de morte celular, sob a modulação farmacológica destes receptores;
- Avaliar o tratamento de quimioterápicos como o metotrexato nas linhagens de meduloblastoma humano e evidenciar sua ação sobre a enzima ecto-5'NT/CD73;
- Caracterizar a expressão do sistema purinérgico em biópsias de meduloblastoma humano e buscar uma possível relação com vias intracelulares descritas por predizerem o prognóstico para os pacientes.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Kumar V, Fausto N, Mitchel R (2007). Robbins: Basic Pathology. Philadelphia: Saunders Elsevier, 8<sup>th</sup>ed:176-177.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009). Purinergic Signaling in the Nervous System: an overview. *Trends in Neuroscience*, 32(1):19-29.
- Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, Bolognesi C, Menelli M, Wieckowski MR, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F (2005). Basal Activation of the P2X7 ATP Receptor Elevates Mitochondrial Calcium and Potential, Increases Cellular ATP Levels, and Promotes Serum-independent Growth. *Molecular Biology of the Cell*, 16:3260-3272.
- Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzani L, Capece M, Chiozzi P, Bianchi G, Kroemer G, Pistoia V, Di Virgilio F (2012). Expression of P2X7 Receptor Increases *in vivo* Tumor Growth. *Microenvironment and Immunology*, 72:2957-2969.
- Ayala G, Tuxhorn JA, Wheeler TM (2003). Reactive Stroma as a Predictor of Biochemical-Free Recurrence in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 9:4792-4801.
- Bacus SS, Gudkov AV, Lowe M, Lyass L, Yung Y, Komarov AP, Keyomarsi K, Yarden Y, Seger R (2001). Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (Erk and p38) and is independent of p53. *Oncogene*, 20(2):147-155.
- Bartlett F, Kortmann R, Saran F (2013). Medulloblastoma. *Clinical Oncology*, 25:36-45.
- Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A, Battastini AMO (2008). The Role of Ecto-5'-

nucleotidase/CD73 in Glioma Cell line Proliferation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 319(1-2):61-68.

- Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ (2012). CD73: a Potent Suppressor of Antitumor Immune Responses. *Trends in Immunology*, 33(5):231-237.
- Bodin P, Burnstock G (2001). Purinergic Signalling: ATP Release. *Neurochemical Research*, 26(8-9):959-969.
- Boison D (2008). Adenosine as a Neuromodulator in Neurological Diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(1):2-7.
- Bonora M, Patergnani S, Rimessi A, Marchi ED, Suski JM, Bononi A, Giorgi C, Marchi S, Missirole S, Poletti F, Wieckowski MR, Pinton P (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic signaling*, 8:343-357.
- Braganhol E, Tamajusuku ASK, Bernardi A, Wink MR, Battastini AMO (2007). Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U283MG glioma cell line. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770:1352-1359.
- Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppes D, Meurer L, Edelweiss MIA, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AMO (2009). Selective NTPDase2 Expression Modulates *in vivo* Rat Glioma Growth. *Cancer Science*, 100(8):1434-1442.
- Braganhol E, Wink MR, Lenz G, Battastini AM (2013). Purinergic Signaling in Glioma Progression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 986:81-102.
- Brande AA, Paris MK (2004). Review of the Prognostic Factors in Medulloblastoma of Children and Adults. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 50:121-128.
- Burnstock G (1978). A Basis for Distinguishing Two Types of Purinergic Receptor, in *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*. Raven Press, 107-118.

- Burnstock G (2006a). Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling. *Pharmacological Reviews*, 58:58-86.
- Burnstock G (2006b). Purinergic signaling. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1:S172-181.
- Burnstock G (2008). Pathophysiology and therapeutic Potential of Purinergic Signaling. *Pharmacological Reviews*, 58:58-86.
- Castillo CA, Albasanz JL, Fernández M, Martín M (2007). Endogenous Expression of Adenosine A1, A2 and A3 Receptors in Rat C6 Glioma Cells. *Neurochemistry Research*, 32:1056-1070.
- Cappellari AR, Vasques GJ, Bavaresco L, Braganhol E, Battastini AMO (2011). Involvement of Ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG Glioma Cell Adhesion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 359(1-2):315-322.
- Corriden R, Insel PA (2010). Basal Release of ATP: An Autocrine-Paracrine Mechanism for Cell Regulation. *Science Signaling*, 3(104):rel.
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro, Stojilkovic SS (2011). Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels. *Pharmacological Reviews*, 63:641-683.
- Czajkowski R, Baranska J (2002). Cross-talk Between the ATP and ADP nucleotide receptor signaling pathways in glioma C6 cells. *Acta Biochimica Polonica*, 49(4):877-889.
- Di Virgilio F (2005). Purinergic Mechanism in the Immune System: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling*, 1:205-209.

- Di Virgilio F, Ferrari D, Adinolfi E (2009). P2X7: a Growth-promoting Receptor – Implications for Cancer. *Purinergic Signalling*, 5:251-256.
- Dirks PB (2010). Brain tumor stem cells: The Cancer stem cell hypothesis writ large. *Molecular Oncology*, 4:420-430.
- Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, Lusher ME, Weston CL, Taylor RE, Pearson AD, Clifford SC (2005). B-catenin Status Predicts a Favorable Outcome in Childhood Medulloblastoma: the United Kingdom Children’s Cancer Study Group Brain tumor Committee. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31):7951-7957.
- Fan X, Eberhart CG (2008). Medulloblastoma Stem Cells. *Journal of Clinical Oncology*, 26(17):2821-2827.
- Fields RD, Burnstock G (2006). Purinergic Signalling in Neuron-glia Interactions. *Nature Reviews – Neuroscience*, 7: 423–436.
- Franke H, Krügel U, Illes P (2006). P2 Receptors and Neuronal Injury. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 452(5):622-44.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 53:527-552.
- Fruehwald-Pallamar J, Puchner SB, Rossi A, Garre ML, Cama A, Koelblinger C, Osborn AG, Thurnher MM (2011). Magnetic Resonance Imaging Spectrum of Medulloblastoma. *Neuroradiology*, 53(6):387-396.
- Gehring MP, Pereira TCB, Zanin RF, Borges MC, Braga Filho A, Battastini AMO, Bogo MR, Lenz G, Campos MM, Morrone FB (2012). P2X7 receptor activation leads to

increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line. *Purinergic Signalling*, 8:729-739.

- Giangaspero F, Bigner SH, Kleihues P, Pietsch T, Trojanowski JQ (2000). Medulloblastoma. In: Kleihues P, Cavenee W, eds. Pathology and genetics of tumors of the Central Nervous System. *International Agency for Research on Cancer*, 129-137.
- Gilbertson RJ, Ellison DW (2008). The Origins of Medulloblastoma Subtypes. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3:341-365.
- Goding JW, Groben B, Slegers H (2003). Physiological and Pathophysiological functions of the Ecto-nucleotide Pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1638:1-19.
- Grizzi F, Weber C, Di Ieva A (2008). Antiangiogenic Strategies in Medulloblastoma: Reality or Mystery. *Pediatric Research*, 63(5):584-590.
- Grobben B, Anciaux K, Roymans D, Stefan C, Bollen M, et al. (1999). An Ecto-nucleotide Pyrophosphatase is One of the Main Enzymes Involved in the Extracellular Metabolism of ATP in Rat C6 Glioma. *Journal of Neurochemistry*, 72: 826–834
- Guessous F, Li Y, Abounader R (2008). Signaling Pathways in Medulloblastoma. *Journal of Cellular Physiology*, 217:577-583.
- Ham J, Evans BAJ (2012). An Emerging Role for Adenosine and its Receptors in Bone Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 3(113):1-8.
- Huse JT, Holland EC (2010). Targeting Brain cancer: Advances in the Molecular Pathology of Malignant Glioma and Medulloblastoma. *Nature Reviews – Cancer*, 10:319-331.

- Junger WG (2011). Immune Cell Regulation by Autocrine Purinergic Signalling. *Nature Review immunology*, 11:201-212.
- Koeller KK, Rushing EF (2003). Medulloblastoma: A Comprehensive Review with Radiologic-Pathologic Correlation. *RadioGraphics*, 23:1613-1637.
- Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie ÉG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sévigny J (2005). Comparative Hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling*, 1:193-204.
- Lazarowski ER (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signalling*, 8:359-373.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler Od, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007). The 2007 WHO Classification of tumors of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2):97-109.
- Massimino M, Giangaspero F, Garrè ML, Gandola L, Poggi G, Biassoni N, Gatta G, Rutkowski S (2011). Childhood Medulloblastoma. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 79:65-83.
- Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani k, Gessi S, Klotz KN, Leung E, Baraldi PG, Borea PA (2002). Adenosine Receptors as Mediators of Both Cell Proliferation and Cell Death of Cultured Human Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 119:923-933.
- Millán JL (2006). Alkaline Phosphatases – Structure, Substrato Specificity and functional Relatedness to Other Members of a Large Superfamily of Enzymes. *Purinergic Signalling*, 2:335-341.

- Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, Bernardi A, Schwartzmann G, Rodnight R, Lenz G (2003). Extracellular Nucleotides and Nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *Journal of neuro-Oncology*, 64:211-218.
- Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJF, Salbego CG, Lenz G, Battastini AMO (2005). Increased Resistance of Glioma Cell Lines to Extracellular ATP Cytotoxicity. *Journal of Neuro-Oncology*, 71:135-140.
- Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MIA, Lenz G, Battastini AMO (2006). In vivo Glioblastoma Growth is Reduced by Apirase Activity in a Rat Glioma Model. *BMC Cancer*, 6:226.
- Mrdak M, Mihajlovic M, Nikolic I, Repac N, Jovanovic V, Scepanovic V, Janicijevic A, Bogdanovic I, Nestorovic B, Tasic G (2012). The Results of Treatment of Primary Brain Tumors in children. *Acta Chirurgica Iugoslavica*, 59:45-48.
- Phelps PT, Anthes JC, Correl CC (2006). Characterization of adenosine receptors in the human bladder carcinoma T24 cell line. *European Journal of Pharmacology*, 536:28-37.
- Polakis P (2000). Wnt Signaling and cancer. *Gene & Development*, 14:1837-1851.
- Ralevic V, Burnstock G (1998). Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 50(3):413-492.
- Rapaport, E (1990). Mechanisms of anticancer activities of adenine nucleotides in tumor-bearing hosts. *Annual of the New York Academy of Sciences*, 603:142-149.
- Rayah A, Knellopoulos JM, Di Virgilio F (2012). P2 Receptors and Immunity. *Microbes and Infection*, 14:1254-1262.

- Resende RR, Majumber P, Gomes KN, Britto LRG, 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.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathological significance. *Purinergic Signalling*, 2:409-430.
- Ryu JK, Jantaratnotai N, Serrano-Rerez MC, McGeer PL, McLarnon JG (2011). Block of Purinergic P2X7R Inhibits Tumor Growth in a C6 Glioma Brain Tumor Animal model. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(1):13-22.
- Sadej R, Spychala J, Skaladanowski AC (2006). Expression of Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell Lines From Various Stages of Human Melanoma. *Melanoma Research*, 16:213-222.
- Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y (2008). Identification of a Vesicular Nucleotide Transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15):5683-5686.
- Schmidt AL, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R, Abujamra AL (2010). Recent Therapeutic Advances for Treating Medulloblastoma: Focus on New Molecular Targets. *CNS & neurological Disorders – Drug Targets*, 9:335-348.
- She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, Dong Z (2001). Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Research*, 61(4):1604-1610.

- Schulte G, Fredholm BB (2003). Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cellular Signalling*, 15(9): 813-827.
- Smoll NR, Drummond KJ (2012). The incidence of Medulloblastomas and Primitive Neuroectodermal Tumors in Adults and Children. *Journal of Clinical Neuroscience*, 19:1541-1544.
- Spychala J (2000) Tumor-promoting Functions of adenosine. *Pharmacology & Therapeutics*, 87:161-173.
- Spychala J, Kitajewski J (2004). Wnt and beta-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. *Experimental Cell Research*, 296: 99–108
- Stefan C, Jansen S, Bollen M (2005). NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in Biochemical Science*, 30:542–550.
- Stefan C, Jansen S, Bollen M (2006). Modulation of Purinergic Signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signalling*, 2:361-370.
- Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Azambuja AA, Barrios CH, Morrone FB, Oliveira Battastini AM (2010). *Urology Oncology*, 28(3):260-267.
- Sträter N (2006). Ecto-5'-nucleotidase: Structure functions relationships. *Purinergic Signalling*, 2:343-350.
- Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, Szade J, Czapiewski P, Biernat W, Zaczek A (2012). CD73 expression as a Potential Marker of Good Prognosis in Breast Carcinoma. *Applied of immunohistochemistry and molecular morphology*, 20(2):103-107.

- Thuler LCS, Sant'Ana DR, Rezende MCR (2011). ABC do Câncer: Abordagens Básicas Para o Controle do Câncer/Instituto Nacional de Câncer – INCA/Rio de Janeiro. ISBN 978-85-7318-188-3 (versão impressa).
- Tamajusuku SK, Villodre ES, Paulus R, Coutinho-Silva R, Battastini AMO, Wink MR, Lenz G (2010). Characterization of ATP-Induced Cell Death in the GL261 Mouse Glioma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109:983-991.
- Verkhasky A, Krishtal OA, Burnstock G (2009). Purinoceptors on Neuroglia. *Molecular Neurobiology*, 39(3):190-208.
- Villar J, Arenas MI, MacCarthy CM, Blaquez MJ, Tirado OM, et al. (2007). PCPH/ENTPD5 Expression Enhances the Envasiveness of Human Prostate Cancer Cells by a Protein Kinase C delta-Dependent Mechanism. *Cancer Research*, 67:10859–10868
- Volonté C, Amadio S, D'Ambrosi N, Colpi M, Burnstock G (2006). P2 Receptor Web: Complexity and fine-tuning. *Pharmacology & Therapeutics*, 112:264-280.
- Weisman GA, Ajit D, Garrad R, Peterson TS, Woods LT, Thebeau C, Camden JM, Erb L (2012). Neuroprotective roles of the P2Y<sub>2</sub> Receptor. *Purinergic Signalling*, 8:559-578.
- White N, Butler PE, Burnstock G (2005). Human melanoma express P2X7 receptors. *Cell tissue Research*, 321:411-418.
- White N, Burnstock G (2006). P2 receptors and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(4):211-217.
- Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Casali EA, Karl J, Barreto-Chaves ML, Sarkis JFF, Battastini AMO (2003a). Extracellular Adenine Nucleotides Metabolism in

Astrocyte Cultures From Different Brain Regions. *Neurochemistry International*, 43:621-628.

- Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Schwartzmann G, Sarkis JJF, Battastini AMO (2003b). Altered Extracellular ATP, ADP and AMP Catabolism in Glioma Cell Lines. *Cancer Letters*, 198:211-218.
- Wu J, Li G, Feng J, Pu Z (2006). Molecular Mechanisms of Adenosine-induced apoptosis in human HepG2 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(4):477-484.
- Yamboliev IA, Smyth LM, Durnin L, Dai Y, Mutafova-Yambolieva VN (2009). Storage and Secretion of  $\beta$ -NAD, ATP and dopamine in NGF-differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells. *The European Journal of Neuroscience*, 30(5):756-768.
- Yasuda Y, Saito M, Yamamura T, Yaguchi T, Nishizaki T (2009). Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A2a adenosine receptors. *Journal of Gastroenterology*, 44:56-65.
- Yegutkin GG (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783:673-694.
- Zhang B (2011). CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncology*, 1(1):67-70.
- Zimmermann H (2000). Extracellular Metabolism of ATP and Other Nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362:299-309.
- Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012). Cellular Function and Molecular Structure of Ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling*, 8(3):437-502.

## **8. ANEXOS**

## **8 Anexos**

### **8.1 Outros artigos científicos publicados durante o período do doutorado**

1. Cappellari AR, Vasques GJ, Bavaresco L, Braganhol E, Battastini AM (2011). Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion. *Mol Cell Biochem*, 359(1-2):315-322.
2. Braganhol E, Zanin RF, Bernardi A, Bergamin LS, Cappellari AR, Campesato LF, Morrone FB, Campos MM, Calixto JB, Edelweiss MI, Wink MR, Sévigny J, Robson SC, Battastini AM (2012). Overexpression of NTPDase2 in gliomas promotes systemic inflammation and pulmonary injury. *Purinergic Signal*, 8(2):235-243.
3. Rockenbach L, Bavaresco L, Fernandes Farias P, Cappellari AR, Barrios CH, Bueno Morrone F, Oliveira Battastini AM (2011). Alterations in the extracellular catabolismo of nucleotides are involves in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. [Epub ahead of print].
4. Glaser T, Cappellari AR, Pillat MM, Iser IC, Wink MR, Battastini AM, Ulrich H (2012). Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration. *Prinergic Signal*, 8(93):523-537.

**8.2 Cópia do certificado de aprovação do comitê de ética para o desenvolvimento dos experimentos com o uso de animais.**



Universidade de São Paulo  
Instituto de Química

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Investigação do envolvimento da Ecto-5'-NT/CD73 na progressão dos meduloblastomas”, desenvolvido sob responsabilidade do Prof. Dr. **Alexander Henning Ulrich**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 20/09/2010.

We attest that the project entitled “Investigação do envolvimento da Ecto-5'-NT/CD73 na progressão dos meduloblastomas”, developed under the responsibility of Dr. **Alexander Henning Ulrich**, in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 09/20/2010.

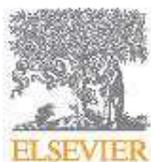
São Paulo, 20 de setembro de 2010

---

Profa. Dra. Nadja C. de Souza Pinto  
Coordenadora CECUA

### **8.3 Instruções das revistas aos autores para submissão de artigo científico**

### **8.3.1 Artigo 1: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**



# THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY

## AUTHOR INFORMATION PACK

### TABLE OF CONTENTS

---

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 1357-2725

### DESCRIPTION

---

The *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* publishes articles in all areas of contemporary **cell** and **molecular biology** and **biomedical research**. This includes **cellular** and **biochemical** mechanistic studies of cells, cell organelles, sub-cellular molecular pathways and metabolism.

We welcome manuscripts that provide novel insights into basic cellular and molecular processes or disease pathogenesis, and encourage [submission](#) of manuscripts with relevance to bioinformatics, nanobiology, synthetic biology, or complexity science. We encourage inclusion of *in vivo* studies and integrated systems approaches to better understand the cellular and molecular basis of whole-organism physiological and pathological processes.

The journal publishes original research papers, invited reviews, In Focus articles, and short communications. For more information on each of these article types, please refer to the "[Format Requirements](#)" document.

### AUDIENCE

---

Pure and applied scientists with a research interest in any aspect of modern biochemistry and cell biology.

### IMPACT FACTOR

---

2011: 4.634 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

BIOSIS  
Chemical Abstracts  
Current Contents/BIOMED Database  
Current Contents/Life Sciences  
Current Contents/SciSearch Database  
Current Contents/Science Citation Index  
EMBASE  
EMBiology  
Elsevier BIOBASE  
ISI Science Citation Index  
MEDLINE®  
Research Alert  
Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### ***Editor-in-Chief:***

**Geoffrey Laurent**, Rayne Inst., Div. of Medicine, University College London (UCL), 5 University St, London, WC1E 6JJ, UK

### ***Managing Editor:***

**Joanna Kargul**, Imperial College London

### ***Directed Issues Editor***

**Irmgard Irminger-Finger**, Lab. of Molecular Gynecology & Obstetrics, Geneva University Hospitals, Blvd de la Cluse, 30, CH-1211 Geneva, Switzerland

### ***Editors for Americas:***

**Marja Nevalainen**, Kimmel Cancer Center, Dept. of Cancer Biology, Thomas Jefferson University, 233 S. 10th Street, Philadelphia, PA 19107, USA

**Richard Pestell**, Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, 233 S. 10th Street, Philadelphia, PA 19107, USA

### ***Editors for Australia and Asia:***

**Rodney Minchin**, School of Biomedical Sciences, University of Queensland, St. Lucia, QLD 4072, Australia

### ***Reviews Editor:***

**Josephine Adams**, Dept. of Biochemistry, University of Bristol, University Walk, Bristol, BS8 1TD, UK

### ***Medicine in Focus Editor:***

**Lucia Altucci**, Dipart. di Patologia Generale, Seconda Università degli Studi di Napoli, via De Crecchio Luigi 7, 80138 Napoli, Italy

### ***Signalling Networks in Focus Editor:***

**Maddy Parsons**, The Randall Div. of Cell and Molecular Biophysics, New Hunt's House, King's College London, Guy's Campus, London, SE1 1UL, UK

### ***Cells in Focus Editor:***

**Philip Poronnik**, School of Medical Sciences, Toxicology Key Centre, RMIT University, PO Box 71, Plenty Rd., Bundoora, VIC 3083, Australia

### ***Molecules in Focus Editor:***

**Ruth Chiquet-Ehrismann**, Biomedical Research, Friedrich Miescher Institute (FMI), Maulbeerstrasse 66, 4058 Basel, Switzerland

### ***Organelles in Focus***

**Rodrigue Rossignol**, INSERM U688 Physiopathologie Mitochondriale, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France

### ***Editorial Board:***

**H.R. Arias**, California Northstate University, Elk Grove, CA, USA

**D. Attaix**, INRA de Clermont-Ferrand/Theix, Ceyrat, France

**A. August**, Cornell University, Ithaca, NY, USA

**M.A. Bogoyevitch**, University of Melbourne, Parkville, Australia  
**S.G. Chen**, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, OH, USA  
**Y.-G. Chen**, Tsinghua University, Beijing, China  
**A.J. Clarke**, University of Guelph, Guelph, Canada  
**A. Clement**, Hôpital Trousseau, Paris, France  
**M. Dragunow**, University of Auckland, Auckland Mail Centre, Auckland, New Zealand  
**M. Gimona**, Paracelsus Private Medical University PMU, Salzburg, Austria  
**B. Halliwell**, National University of Singapore (NUS), Singapore, Singapore  
**X. Han**,  
**V.R. Harley**, Prince Henry's Institute of Medical Research, Clayton, VIC, Australia  
**J. Heino**, University of Turku, Turku, Finland  
**K. Igarashi**, Chiba University, Chiba, Japan  
**P. Jezek**, Academy of Sciences of the Czech Republic, PRAHA 4, Czech Republic  
**S.R. Kimball**, Penn State University College of Medicine, Hershey, PA, USA  
**P. Knaus**, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany  
**D. Knight**, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada  
**M Königshoff**, Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), München, Germany  
**T Lawrence**, CNRS-INSERM-Université de la Méditerranée, Marseille, France  
**S.J. Leibovich**, University of Medicine and Dentistry New Jersey (UMDNJ), Newark, NJ, USA  
**P.S. Leung**, Chinese University of Hong Kong, Shatin, N.T., Hong Kong  
**R.B. Lock**, Sydney Children's Hospital, Randwick, NSW, Australia  
**E.J. Mackie**, University of Melbourne, Parkville Victoria, VIC, Australia  
**B.J. Marshall**, University of Western Australia, Nedlands, WA, Australia  
**C.L. Masters**, University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia  
**S. Meiners**, Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), München, Germany  
**M. Michalak**,  
**Y. Moriyama**,  
**T. Mörröy**, Institut de recherches cliniques de Montreal (IRCM), Montréal, QC, Canada  
**H. Nagase**, Imperial College London, London, UK  
**V. Niggli**, Universität Bern, Bern, Switzerland  
**F. Oakley**, Newcastle University, Newcastle, UK  
**H. Osborn**, University of Reading, Reading, Whiteknights UK  
**M. Ouellete**, Centre de Recherche en Infectiologie du CHUL, Quebec City, QC, Canada  
**A.G. Papavassiliou**, University of Athens Medical School, Athens, Greece  
**S. Pervaiz**, National University of Singapore (NUS), Singapore, Singapore  
**J. Pimanda**, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia  
**I. Richard**, Génométhod, Evry, France  
**L.Y. Sakai**, Shriners Hospital, Portland, OR, USA  
**J.-M. Sallenave**, Institut Pasteur, Paris, France  
**P.A. Townsend**, University of Southampton, Southampton, UK  
**J.R. Vandenheede**, KU Leuven, Leuven, Belgium  
**N. Vergnolle**, INSERM, Toulouse Cedex, France  
**G.C. Yeoh**, University of Western Australia, Crawley, WA, Australia  
**Q. Yu**, Genome Institute of Singapore, Singapore, Singapore  
**G-J Zhang**, Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong Province, China  
**M.H. Zheng**, University of Western Australia, Crawley, WA, Australia  
**X. Zhu**, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, OH, USA

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

For a description of the journal's aims and scope, please [click here](#)

For the journal's Peer Review Policy please [click here](#)

For detailed information on the required format for each article type published in IJBCB (original research papers, Full-length Reviews and In Focus short surveys) please go to "[Format Requirements](#)"

Authors are urged to use the [Preparation checklist for illustrations](#) see the paragraph [Electronic Artwork](#) in this document

Manuscripts should contain evidence of submission of nucleic acid sequences to appropriate databanks.

Manuscripts should contain a word count.

Should the Editor request a revision, a revised version of the manuscript should be submitted within eight weeks. After this period, the article will be seen as a new submission.

#### *Types of articles*

(see [Format Requirements](#))

The journal publishes

- Short communications (up to 3,000 words)
- Regular articles (no invitation required, up to 5,000 words)
- Full-length reviews (upon invitation, 5,000 - 7,000 words)
- In Focus articles (upon invitation, up to 2,000 words)

Word counts are exclusive of references.

#### *Contact details for submission*

For questions on the submission and reviewing process, please contact Joanna Kargul, Managing Editor at [ijbcb@ucl.ac.uk](mailto:ijbcb@ucl.ac.uk).

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### *Conflict of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

#### *Conflict of interest*

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

#### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere

in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal does not ordinarily have publication charges; however, authors can now opt to make their articles available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform, for which a fee of \$3000 applies (for further information on open access see <http://www.elsevier.com/about/open-access/open-access-options>). Please note that you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication, to avoid any perception of conflict of interest. The fee excludes taxes and other potential costs such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at

<http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

#### *Submit your article*

Please submit your article via <http://www.ees.elsevier.com/bc>

### **Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### **Use of wordprocessing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

### **Article structure**

The structure of the article differs per article type. Please refer to the "[Structure requirements for IJBCB articles](#)" for detailed instructions for each article type.

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### **Highlights**

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

## Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

## Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

## Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

## Artwork

### Electronic Artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Helvetica.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

#### Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Preparation checklist for illustrations

Please ensure that molecular weight markers are included in all immunoblot and gel figures. For comparative studies, all the protein bands must originate from the same gel. Bar graphs must include standard errors or standard deviations. Please avoid over-complicated coding patterns for bars. Micrographs must include scale bars. Appropriately sized numbers, letters, and symbols should be used so they are no smaller than 2.4 mm (10 pt) in size after reduction to a single column width (7.84 cm or 3.085 inches), or a 2-column width (16.5 cm or 6.5 inches). Superscript and subscript characters are included in this rule. Numbers, letters, and symbols used in multi-paneled figures must be consistent. Figures should preferably be drawn to occupy a single column width (7.84 cm or 3.085 inches). Occasionally, the figures may occupy a double column width if such size enhances

presentation. Produce images near to the desired size of the printed version. Make sure that the lettering is such that when the figure is in print, the size of the font is the equivalent to, or slightly larger than the text of the journal. Axis labels should be printed with an initial capital letter followed by lower case lettering with units in open brackets. Axis line width should be uniform and 1 pt in thickness. Column and line diagrams should not be boxed or include gridlines. Use a logical naming convention for your artwork files, and supply a separate listing of the files and the software used.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

- Color charges in print apply only for regular articles, short communications and unsolicited reviews.
- Color in print is free of charge for invited reviews and In Focus articles.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### **References**

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

##### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

##### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

##### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

##### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;  
3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.  
Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated in wheat (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List*: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples*:

Reference to a journal publication:

Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

*Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

## **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

### **8.3.2 Artigo 3: Cancer Letters**

#### Guide for Authors

##### **Types of papers**

*Cancer Letters* welcomes submissions of full-length original research papers and Minireviews. The act of submitting a manuscript to the journal carries with it the right to publish that paper. The main object of the journal is the publication of papers with particular reference to the human species. These should appeal to clinicians and research workers alike. Original research papers should deal with original research not previously published or being considered for publication elsewhere. Minireviews should provide concise overviews of the current research and/or clinical status of the topics under discussion. They should discuss published data. Minireviews should not present primary unpublished data. *Cancer Letters* does not publish Case Reports.

All original papers submitted to *Cancer Letters* will be evaluated by the Journal's Editors.

The Editorial Office has adopted a rating system, in order to establish which manuscripts will be sent out for peer review. The rating system allows the Editor to assess the manuscript in terms of the following criteria:

- \* Presentation
- \* Style and structure
- \* Quality of English language
- \* Whether the topic being covered is within the aims and scope of the journal
- \* The manuscript's scientific novelty together with how it compares to other manuscripts submitted on similar topics.

Those manuscripts which are judged as being eligible for consideration by the Editors will be subject to peer review.

##### **Ethics and Procedures**

The editors and publisher of this Journal believe that there are fundamental principles underlying scholarly or professional publishing. While this may not amount to a formal "code of conduct", these fundamental principles with respect to the authors' paper are that the paper should:

- \* be the authors' own original work, which has not been previously published elsewhere
- \* reflect the authors' own research and analysis and do so in a truthful and complete manner,
- \* properly credit the meaningful contributions of co-authors and co-researchers,

\* not be submitted to more than one journal for consideration (ensuring it is not under redundant simultaneous peer review), and

\* be appropriately placed in the context of prior and existing research.

Of equal importance are ethical guidelines dealing with research methods and research funding, including issues dealing with informed consent, research subject privacy rights, conflicts of interest, and sources of funding. While it may not be possible to draft a "code" that applies adequately to all instances and circumstances, we believe it useful to outline our expectations of authors and procedures that the Journal will employ in the event of questions concerning author conduct. Relevant conflicts of interest should be disclosed ([see http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/conflictsofinterest](http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/conflictsofinterest)).

Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines.

### **Submission of manuscripts**

*Cancer Letters* has moved to an online submission and review system. Manuscripts should be submitted online at <http://www.ees.elsevier.com/can> and the instructions on the site should be closely followed. Authors may submit manuscripts and track their progress through to final decision. Reviewers can download manuscripts and submit their reports to the Managing Editors.

Authors unable to submit online should contact the Editorial Office:

Cancer Letters Editorial Office

Elsevier Ltd

The Boulevard

Langford Lane

Oxford OX5 1GB

U.K.

Tel : +44 (0)1865 843203

Fax : +44 (0)1865 843992

Email : [cancerletters@elsevier.com](mailto:cancerletters@elsevier.com)

Submission of an article to *Cancer Letters* implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible

authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or any other language, without the written consent of the Publisher.

Manuscripts should be submitted online at <http://www.ees.elsevier.com/can> and should be in English. Authors' full names, academic or professional affiliations, and addresses should be included on the first page. All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or the acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted. The name, postal address, email address, phone and FAX numbers of the corresponding author should be provided. Authors should supply the names and email addresses of 3 to 5 potential reviewers for their manuscript. To provide an international perspective, no more than 2 potential reviewers should be from the same country. Please do not suggest reviewers from your own institution, previous or current collaborators or Editorial Board members. Without reviewer suggestions, processing of the manuscript may be delayed. Please do not contact any reviewers that you have suggested.

Online submission guidelines can be followed at <http://www.ees.elsevier.com/can>. Via this website you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files into a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer review process. Please note that although manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by email and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

### **Manuscript preparation**

Please strive for a professionally prepared manuscript of high technical and scientific quality. Many reviewers are overwhelmed with review requests. Our experience is that they are more likely to agree to review a well prepared manuscript.

Articles should be submitted in the following order : Title, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References.

Please number the headings in your manuscript as follows:

1. Introduction; 2. Materials and methods; 3. Results; 4. Discussion, etc.; with further numbering for subheadings (e.g. 1.1, 1.2, etc) as required.

All submissions must be accompanied by a covering letter in which the significance of the results is outlined in no more than 5 sentences.

Title must address the main result of the study and preferably not exceed 185 characters, including spaces.

Extraneous words such as 'study' 'investigation', 'analysis', etc, should be avoided.

**Abstract.** A concise and factual abstract not exceeding 80-100 is required, followed by 3-6 indexing terms (keywords).

The abstract should briefly state the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone.

Tables should be typed, with double spacing, each on a separate sheet, numbered consecutively with Roman numerals, and should only contain horizontal lines. A short descriptive heading should be given above each table, and any footnotes and explanations underneath.

Figures must be numbered and keyed into the text. For advice on correctly formatting electronic images, please refer to <http://authors.elsevier.com>. For illustrations that cannot be submitted electronically, please send them by post to the Editorial Office. The author's name, the figure number and an arrow identifying orientation should be appended to the reverse of each illustration. Line drawings (including graphs) must be in black ink on a white background.

Alternatively, sharp photographs on glossy paper may be provided. The lettering should be large enough to permit photographic reproduction. Halftone illustrations may be included, which should be submitted as black and white prints on glossy paper and have as much contrast as possible. All legends should be typed on a separate sheet of paper. Composite illustrations should be sensibly and compactly arranged as a plate, without leaving much empty white space between the different elements.

Illustrations should be designed for use in either a single column (7.5cm) or a double column (16cm). Actual magnification of all photomicrographs should be indicated by a micron bar or in the legend.

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable electronic colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g. ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

**Acknowledgements.** All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely

technical help, writing assistance, or a departmental chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for that assistance.

**Conflict of Interest.** At the end of the text, under a subheading "Conflict of Interest Statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

**Role of the Funding Source.** All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of the study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

References should be numbered and listed on a separate sheet. Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "... as demonstrated [3,4]. Barnaby and Jones [5] obtained a different result?"

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2000) 51-59

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 1999, pp281-304.

Supplementary data is accepted by *Cancer Letters* to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional responsibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:<http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please

ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions, please visit our artwork instruction pages at the Author Gateway at <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Authors In Japan please note: if you would like information about how to have the English of your paper checked, corrected and improved (before submission), please contact our Tokyo office who will inform you of the services provided by language correctors:

Elsevier, 9-15, Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106, Japan.

Tel. (+81) 3-5561-5033; Fax (+81) 3-5561-5047; E-mail: [info@elsevier.co.jp](mailto:info@elsevier.co.jp)

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright, see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases : contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: Tel. (+1) 215 238 7869; Fax (+1) 215 238 2239; e-mail [healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com). Requests may also be completed online via the Elsevier homepage ( <http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

### **US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy**

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NOH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMedCentral on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com)) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMedCentral on your behalf a version of your manuscripts that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMedCentral, and any such posting is prohibited.

## Author's rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following :

- Make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use.
- Make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g. via an e-mail list or list server).
- Post a pre-print version of the article on Internet websites including pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites.
- Post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage ([onhttp://www.elsevier.com](http://www.elsevier.com)).
- Present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting.
- For your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g. training).
- Retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article.
- Include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially).
- Use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal).
- Prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal.

Proof reading. When you receive a (PDF) proof (as an e-mail attachment) of your article for correction, it is important to ensure that all your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible.

Electronic Offprints (e-offprints). The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author enquiries. Authors can also keep track of the progress of their accepted article, and set up email alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's Author Gateway ( <http://authors.elsevier.com>).

For specific enquiries on the preparation of electronic artwork, consult <http://authors.elsevier.com>.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

*Cancer Letters* has no page charges.

**Sponsored Articles:**

Cancer Letters offers authors or their institutions the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please click [here](#).