



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARINA PETERSEN GEHRING

INTERAÇÃO ENTRE O RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 E A INTERLEUCINA-17
EM LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO

Porto Alegre

2012

MARINA PETERSEN GEHRING

**INTERAÇÃO ENTRE O RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 E A
INTERLEUCINA-17 EM LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia e Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a Dr Fernanda Bueno Morrone

Porto Alegre

2012

MARINA PETERSEN GEHRING

**INTERAÇÃO ENTRE O RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 E A
INTERLEUCINA-17 EM LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia e Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª Dr Carla Denise Bonan – PUCRS

Prof^ª Dr Denise Cantarelli Machado – PUCRS

Prof^a.Dr. Ana Paula Horn – FURG

Prof^ª Dr Rosane Souza da Silva – PUCRS

Porto Alegre

2012

*Dedico esta tese a minha família que
sempre incentivou e apoiou meu crescimento
profissional.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Fernanda Bueno Morrone por acreditar no meu potencial, por me dar oportunidades de aprendizado, pela sua orientação, incentivo e carinho.

À Professora Doutora Maria Martha Campos por compartilhar o seu conhecimento e colaborar com este trabalho.

À minha família pelo apoio, sempre.

A todos os meus amigos que entenderam minha ausência em determinados períodos e por compartilharem das tristezas aos sorrisos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia pelo companheirismo e por tornarem o ambiente de trabalho tão alegre e motivante.

A Capes pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

O glioblastoma multiforma (GBM) é considerado o mais agressivo tumor do sistema nervoso central (SNC), e o mais letal entre os tumores primários. Apesar dos gliomas malignos serem geralmente tratados com radioterapia, muitas vezes estes exibem uma significativa radioresistência que limita o sucesso do tratamento. Pode-se postular que mudanças moleculares comuns observadas nestes tumores contribuem para essa resistência. O nucleotídeo ATP é uma importante molécula de sinalização no SNC e um ligante seletivo do receptor purinérgico P2X7 (P2X7R) em altas concentrações. Estudos mostram que o P2X7R é responsável pela morte induzida pelo ATP em vários tipos de células, porém, algumas células de glioma humano mostram-se resistentes à morte induzida pelo ATP. Além da resistência ao ATP, pacientes com GBM espontaneamente desenvolvem resistência a respostas imunes antitumorais. Estudos levantam a necessidade de uma indução exógena do sistema imunológico a fim de gerar uma resposta antitumoral. A IL-17 é um citocina pró-inflamatória e seu papel no câncer ainda é desconhecido. O presente trabalho primeiramente objetivou caracterizar uma linhagem de glioma humano radiosensível quanto à sensibilidade ao ATP e investigar se a ativação do P2X7R poderia estar envolvida na morte destas células. Além disso, visou elucidar a susceptibilidade do receptor da IL-17 à radioterapia, bem como, o efeito da IL-17 e uma possível interação entre esta citocina e o P2X7R em células de glioma humano. As linhagens celulares de glioma humano U-138 MG e U-251 MG mostraram-se resistentes à morte, quando tratadas com ATP (5 mM) ou BzATP (100 µM), agonista seletivo do P2X7R. Na linhagem de glioma radiosensível M059J, o tratamento com alta concentração de ATP (5 mM) ou com BzATP (100 µM), diminuíram significativamente a viabilidade celular ($32,4\% \pm 4,1$ e $24,6 \pm 4,0\%$, respectivamente). A linhagem M059J expressou níveis significativamente maiores do P2X7R quando comparada com as linhagens celulares U-138 MG e U-251 MG ($0,40 \pm 0,00$; $0,28 \pm 0,01$ e $0,31 \pm 0,01$, respectivamente) e a irradiação aumentou a expressão do P2X7R em todas as linhagens. Além disso, o antagonista seletivo do P2X7R, A740003 (10 µM), diminuiu significativamente a morte celular causada pela irradiação. Nesta primeira parte do trabalho, fornecemos novas evidências indicando que a linhagem de glioma humano M059J é sensível ao ATP-P2X7R, apontando a relevância do P2X7R na radiosensibilidade do glioma. Na segunda parte deste trabalho, observou-se que o receptor da IL-17 foi significativamente mais expresso após a irradiação (2 Gy) mostrando uma possível participação da via IL-17/R na susceptibilidade à irradiação. O tratamento com a IL-17 (10 ng/ml) diminuiu em aproximadamente 62% a viabilidade de linhagens celulares U-138 MG e M059J de glioma humano. Outros resultados preliminares mostraram que o antagonista do P2X7R foi capaz de reverter parcialmente a toxicidade causada pela IL-17 nestas linhagens. Nossos dados demonstram um papel antitumoral desta citocina e corroboram com a idéia de uma possível interação entre a IL-17/P2X7R. Este trabalho deixa perspectivas de estudos a serem realizados para melhor compreender a ação da IL-17 nos gliomas e a interação IL-17/P2X7R.

Palavras-chave: glioma, receptor P2X7, interleucina-17, irradiação, radiosensibilidade.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive tumor of the CNS and most deadly primary tumors. Despite the malignant gliomas are generally treated with radiotherapy, often they exhibit a significant radioresistance that limits the treatment success. It can be postulated that molecular changes commonly observed in these tumors contribute to this resistance. The nucleotide ATP is an important signaling molecule in CNS and it is a selective P2X7 purinergic receptor (P2X7R) ligand at high concentrations. Some studies have reported that P2X7R is responsible for ATP-induced cell death in various cell types, but some human glioma cells were resistant to death induced by ATP. In addition to ATP resistance, patients with GBM develop spontaneous antitumor immune responses. These studies show the requirement for an exogenous induction of the immune system to generate an antitumor response. IL-17 is a pro-inflammatory cytokine and its role in cancer is already unknown. Herein, we first aimed to characterize a radiosensitive human glioma cell line for sensitivity to ATP and to investigate whether activation of the P2X7R could be involved in the death of this cell line. Furthermore, aimed to elucidate the IL-17 receptor susceptibility to irradiation, as well as, elucidate the effect of IL-17 and a possible interaction between this cytokine and P2X7R in human glioma cells. The human glioma cell lines U-138 MG and U-251 MG were resistant to death when treated with either ATP (5 mM) or BzATP (100 μ M), a selective P2X7R agonist, whereas in the radiosensitive M059J glioma cell line, the high ATP (5 mM) or BzATP (100 μ M), significantly diminished the cell viability ($32.4\% \pm 4.1$ and $24.6\% \pm 4.0$, respectively). The M059J lineage expresses significantly higher P2X7R levels when compared to the U-138 MG and U-251 cell lines (0.40 ± 0.00 ; 0.28 ± 0.01 and 0.31 ± 0.01 , respectively) and irradiation upregulated P2X7R expression in all lineages. Additionally, the selective P2X7R antagonist A740003 (10 μ M) significantly decreased the cell death caused by irradiation. We provided novel evidence indicating that M059J human glioma cell line is ATP-P2X7R sensitive, pointing out the relevance of the purinergic P2X7R in glioma radiosensitivity. The IL-17 receptor was significantly more expressed after irradiation (2 Gy), showing a possible participation of the IL-17/R on the irradiation susceptibility. The treatment with IL-17 (10 ng/ml) diminished approximately 62% the human glioma cell lines viability. Other preliminary result showed that the P2X7R antagonist was able to partially reverse the toxicity caused by IL-17 in these cell lines. Our data show an antitumor role of this cytokine and corroborate to the idea of a possible interaction between IL-17/P2X7R. This work prospects for studies to be conducted to better understanding the action of IL-17 in gliomas and interaction IL-17/P2X7R.

Key-words: glioma, P2X7 receptor, interleukin-17, irradiation, radiosensitive.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Astrocitoma Anaplásico

ADP – Adenosina 5'- difosfato

AKT – Proteína antiapoptótica

ATP – Adenosina 5'- trifosfato

DNA-PK - Proteína quinase dependente-DNA

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

GBM – Glioblastoma Multiforme

GSK-3 β – Glicogênio sintase quinase-3 β

IL – Interleucina

IL-17R – Receptor de Interleucina-17

IFN – Interferon

INK4A-ARF – Proteínas Apoptóticas

JAK – Janus-quinase

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógenos

NF- κ B – Fator Nuclear- κ B

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDGF – Fator de Crescimento derivado de Plaquetas

PDGFR – Receptor do Fator de Crescimento derivado de Plaquetas

PGE2 – Prostaglandina E2

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

RAF - Proteína Quinase Serina/Treonina

RAS – Proteínas Ligadoras de Nucleotídeos de Guanina

SNC – Sistema Nervoso Central

TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento - β

TMZ – Temozolomida

TNF – Fator de Necrose Tumoral

T NKi – célula T Natural Killer invariante

UDP – Uridina 5'- difosfato

UTP – Uridina 5'- trifosfato

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR – Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS	11
1.1.1 Glioblastoma Multiforme (GBM)	13
1.1.2 Gliomas e Irradiação	15
1.2 SISTEMA PURINÉRGICO	17
1.2.1 Receptor P2X7	19
1.2.2 Gliomas, Receptor P2X7 e Irradiação	20
1.3 INFLAMAÇÃO E CÂNCER	22
1.3.1 Interleucina-17 (IL-17)	24
1.3.2 Gliomas, Interleucina-17 e Irradiação.....	25

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27

3 RESULTADOS

3.1 CAPÍTULO I	28
<i>ARTIGO CIENTÍFICO – P2X7 RECEPTOR ACTIVATION LEADS TO INCREASED CELL DEATH IN A RADIOSENSITIVE HUMAN GLIOMA CELL LINE</i>	
3.2 CAPÍTULO II	48
<i>INTERACTION BETWEEN IL-17 AND P2X7R AS A NEW MECHANISM IMPLICATED IN HUMAN GLIOMA CELL PROLIFERATION</i>	

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
------------------------------	----

5 PERSPECTIVAS	69
----------------------	----

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
------------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS

Um relatório recente da Organização Mundial da Saúde (OMS) concluiu que a incidência de câncer em nível mundial dobrou entre 1975 e 2000 (Xu, Li et al. 2010). Entre os tumores mais frequentes, o glioma é uma das formas mais letais (Bidros, Liu et al. 2010) e o tipo mais comum de tumor cerebral primário que afeta adultos (Karrlander, Lindberg et al. 2009; Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010). A incidência global anual de gliomas está na faixa de 5-6/100.000 (Tabela 1) (Weller 2011).

A hipótese atual predominante para a origem do câncer é a teoria da mutação somática. Este conceito é baseado na suposição de que o câncer surge a partir de uma única célula, que adquiriu relevantes distúrbios no ciclo celular principalmente na forma de mutações somáticas. Recentemente, o conceito de células-tronco ganhou muita atenção (Martin-Villalba, Okuducu et al. 2008). Uma importante teoria postula que as células-tronco neurais, ou progenitores neurais, sofrem eventos de transformação quando estão em fase de proliferação durante o desenvolvimento (Yamanaka and Saya 2009; Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010). A transformação maligna das células gliais ocorre em várias etapas de alterações genéticas. Algumas alterações genéticas são comuns a diferentes tipos de tumor. Visando promover o seu crescimento, estes alteram vias de controle do ciclo celular, o que resulta em hipóxia focal, necrose e angiogênese (Yamanaka and Saya 2009). Outras evidências apontam para a desdiferenciação induzida por mutações nas células cerebrais maduras como astrócitos e oligodendrócitos. Os tumores são provavelmente compostos por um grupo heterogêneo de células, incluindo células tumorais diferenciadas e células progenitoras (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010).

Descobertas recentes mostram os eventos moleculares que impulsionam o crescimento do glioma. Estes incluem anomalias em três grandes vias moleculares: fatores de crescimento extracelular e seus receptores, por exemplo, fator de crescimento epidérmico (EGF)/receptor EGFR e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF)/receptor PDGFR, cascatas de transdução de sinal (por exemplo, RAS e AKT) e

controle de proliferação celular (por exemplo, INK4A-ARF) (Lassman 2004; Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010). Normalmente a sinalização pró-crescimento não é suficiente para induzir a formação do tumor e deve ser acompanhada da perda ou alterações críticas em genes que, normalmente, monitoram o crescimento celular (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010).

A classificação dos gliomas, segundo a OMS, é realizada com base na origem celular presumida que distingue gliomas astrocíticos, oligodendrocíticos e mistos. O sistema de classificação é baseado na presença dos seguintes critérios: aumento da densidade celular, atipias nucleares, mitoses, proliferação vascular e necrose (Figarella-Branger, Colin et al. 2008). Como diferentes gliomas compartilham aparências histológicas comuns, a classificação final inclui tanto aspectos histológicos quanto graus de malignidade (Yamanaka and Saya 2009). Os gliomas são classificados em graus I-IV. Os graus I-II são considerados tumores benignos e os graus III-IV, tumores malignos (Karrlander, Lindberg et al. 2009).

Os gliomas de origem astrocitária (astrocitomas) são classificados em astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (AA) (grau III) e glioblastoma multiforme (GBM) (grau IV). Os tumores derivados de oligodendrócitos incluem grau II (oligodendroglioma ou oligoastrocitoma) e grau III (oligodendroglioma ou oligoastrocitoma anaplásico) (Martin-Villalba, Okuducu et al. 2008; Weller 2011). Cada subtipo tem um prognóstico específico que determina a conduta clínica (Yamanaka and Saya 2009).

Tabela 1: Gliomas malignos: epidemiologia e progressão

	Incidência Anual por 100.000	Sobrevivência no 1º ano (%)	Sobrevivência no 3º ano (%)	Sobrevivência no 5º ano (%)
Astrocitoma anaplásico	0,41	60,3	34,7	27,4
Oligodendroglioma anaplásico	0,12	79,9	59,6	49,4
Glioblastoma	3,19	34,6	7,3	4,8

Adaptado de Weller, 2011 (Weller 2011).

O prognóstico para pacientes com gliomas malignos (AA e GBM) é extremamente pobre (Karrlander, Lindberg et al. 2009) e permanece obscuro. A sobrevida média de pacientes com AA é de 2 a 3 anos, para pacientes com GBM é de 10 a 12 meses (Noch and Khalili 2009; Robins, Lassman et al. 2009), com menos de 10% dos pacientes sobrevivendo 2 anos (Robins, Lassman et al. 2009). Nos astrocitomas difusos (grau II) a sobrevida é altamente variável, com uma média de 5 a 10 anos (Keles, Lamborn et al. 2001). Os astrocitomas pilocíticos (grau I) são curáveis por cirurgia e em tumores sintomáticos que não podem sofrer ressecção, utiliza-se irradiação e quimioterapia (Holland 2001). Pacientes diagnosticados com oligodendroglioma têm uma estimativa de sobrevivência de 10 a 15 anos (Yamanaka and Saya 2009).

Uma das características que distingue os tumores astrocíticos, seja ele de alto ou baixo grau, dos outros tumores é a sua natureza infiltrativa difusa. O tumor de origem astrocitária cresce no cérebro misturado com células normais, por isso as bordas do tumor são mal definidas. E é este fato que se acredita estar à base da incurabilidade cirúrgica da maioria destes tumores. É possível que essas células sejam responsáveis pela recorrência do tumor após cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Ainda não é claro o quanto as terapias existentes alcançam essas células e afetam sua sobrevivência (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010).

Entre os sinais e sintomas clínicos mais frequentemente observados nesses tumores estão cefaléia, mudanças cognitivas, papiloedema, disfasia ou hemiparesia progressiva (Yamanaka and Saya 2009). A terapia convencional inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo principalmente paliativa (Frenel, Botti et al. 2009).

1.1.1 Glioblastoma Multiforme (GBM)

Dos cerca de 23.000 novos casos de neoplasias malignas do sistema nervoso central (SNC) diagnosticados anualmente nos Estados Unidos, mais da metade são classificados como GBM (Robins, Lassman et al. 2009). Este é o mais agressivo tumor do SNC (Meijer, Maguire et al. 2009; Robins, Lassman et al. 2009; Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010; Wei, Barr et al. 2010) e o mais letal entre os tumores primários (Noch and Khalili 2009).

O GBM se localiza preferencialmente nos hemisférios cerebrais e afeta tipicamente adultos (Mendonca, Lima et al. 2005). O risco entre idosos é maior, por razões desconhecidas, representando acima de 50% dos casos após 60 anos. É mais frequente em homens do que em mulheres e (Dai and Holland 2001) e a incidência na população idosa de países industrializados está aumentando (Delattre 2011).

O GBM desenvolve-se de duas maneiras: 1) Como um tumor primário (também chamado de "*de novo*") que progride rapidamente sem evidência clínica ou histológica de uma lesão precursora menos maligna. Este afeta principalmente idosos e ocorre na maioria dos casos (90%) (Lassman 2004; Yamanaka and Saya 2009). 2) Como um tumor secundário que é oriundo da progressão de um astrocitoma difuso ou de astrocitoma anaplásico e manifesta-se em pacientes jovens (Lassman 2004; Yamanaka and Saya 2009).

Como o próprio nome diz, o glioblastoma é multiforme, já que apresenta regiões de necrose e hemorragia, além de diversas alterações microscópicas (Holland 2000). As características patológicas do GBM são exemplificadas por proliferação celular descontrolada, infiltração difusa, intensa resistência à apoptose, instabilidade genômica (Yamanaka and Saya 2009), células gigantes, pleomorfismo celular e nuclear (Laws and Shaffrey 1999), necrose e angiogênese especializada (Oliver, Olivier et al. 2009; Yamanaka and Saya 2009), conhecida como a hiperplasia microvascular (Oliver, Olivier et al. 2009).

A ativação ou supressão aberrante de vias de transdução de sinal celular e a resistência à irradiação e à quimioterapia estão associadas com as anormalidades genéticas e moleculares comuns a glioblastomas, contribuindo para a progressão do glioma maligno (Minniti, Muni et al. 2009; Yamanaka and Saya 2009). Uma atenção especial tem sido focada em alvos como os receptores EGFR, PDGFR e o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e em vias como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/AKT e RAS/RAF/MAPK (Minniti et al., 2009). Evidências mostram que o EGF e seu receptor (EGFR) são super-expressos em muitos tumores sólidos, o que pode aumentar a proliferação celular, inibir a apoptose e aumentar a invasão de células malignas (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010; Xu, Li et al. 2010). O aumento da

expressão deste receptor ocorre em aproximadamente 40% a 50% dos glioblastomas primários (Stupp, Hegi et al. 2007; Yamanaka and Saya 2009) e raramente em glioblastomas secundários (Yamanaka and Saya 2009). A formação de novos vasos é controlada por fatores pró e antiangiogênicos, sendo o VEGF um importante fator pró-angiogênico. Em gliomas de alto grau, o VEGF-A, está super-expresso nas células tumorais (Karrlander, Lindberg et al. 2009; Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010).

A cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia com o agente alquilante temozolomida (TMZ) de forma concomitante (radioquimioterapia) representam o padrão atual de tratamento para pacientes com GBM (Minniti, Muni et al. 2009; Weller 2011), seguido por exames de imagem para monitorar a progressão tumoral pós-tratamento (Yang, Huh et al. 2010).

Com os avanços recentes no padrão de tratamento dos tumores cerebrais com o uso das terapias citadas anteriormente, o prognóstico dos pacientes com GBM melhorou de uma média de 10 a 12 meses (Robins, Lassman et al. 2009; Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010) para 14 meses, após o diagnóstico (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010). Porém, por ser um tumor infiltrativo, o prognóstico ainda permanece incerto devido à presença de um tumor cerebral residual altamente invasivo (Ho, Hui et al. 2010; Wei, Barr et al. 2010), resultando em um diagnóstico maior de pseudoprogessão (Yang, Huh et al. 2010), onde células tumorais invasoras escapam da remoção cirúrgica, bem como, da exposição à irradiação e quimioterapia (Yamanaka and Saya 2009).

1.1.2 Gliomas e Irradiação

Há décadas, a radioterapia é de importância fundamental para o tratamento de gliomas (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010). Resultados do tratamento com radioterapia mostram uma melhora modesta na sobrevivência, sem reduzir a qualidade de vida ou cognição, em pacientes idosos com GBM (Keime-Guibert, Chinot et al. 2007).

As vias de transdução de sinal da irradiação na célula envolvem danos ao núcleo (DNA) e ao citoplasma. A irradiação celular induz à quebra da dupla-fita de DNA, que é a forma mais letal de dano ao DNA. Nos mamíferos, quebras na dupla-fita de DNA são geralmente reparadas via proteína quinase DNA-dependente (DNA-PK) (Daido,

Yamamoto et al. 2005; Holgersson, Heiden et al. 2005). Quando o dano ao DNA é excessivo, a DNA-PK induz apoptose. Tipicamente, a irradiação induz apoptose por ativação de p53, Bax e caspases, embora a apoptose independente de p53 também já tenha sido relatada (Bedford and Dewey 2002; Daido, Yamamoto et al. 2005). No citoplasma, a irradiação induz alterações no transporte de elétrons mitocondriais, liberação do citocromo c da mitocôndria, iniciando a clivagem por caspase, que termina em ativação de uma nuclease responsável pela digestão internucleosomal do DNA (Bedford and Dewey 2002).

Para melhorar o controle local e limitar a toxicidade para o tecido cerebral normal, novas técnicas de imagem têm sido exploradas (Robins, Lassman et al. 2009). Estes avanços na radioterapia permitiram que altas doses de irradiação possam ser direcionadas aos tumores com o mínimo possível de toxicidade associada aos tecidos circundantes. No entanto, a persistência do tumor (recorrência local após o tratamento), devido à falha em áreas infiltradas, tem enfatizado a necessidade de melhorar a eficiência do tratamento local (Dutreix, Cosset et al. 2010).

Além disso, apesar dos gliomas malignos serem geralmente tratados com radioterapia, a partir de um ponto de vista clínico, eles exibem uma significativa radioresistência que limita o sucesso do tratamento (Daido, Yamamoto et al. 2005; Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010). Dada esta significativa radioresistência observada clinicamente nos gliomas malignos, pode-se postular que mudanças moleculares comuns observadas nestes tumores contribuam para essa resistência, como as já citadas anteriormente: amplificação/mutação do EGFR e a perda do PTEN, resultando na ativação da PI3K (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010) e alterações nas vias de reparo do DNA como a da DNA-PK (Daido, Yamamoto et al. 2005).

O paradigma oncológico atual de quimioradioterapia é baseado na observação de que a quimioterapia com TMZ pode potencializar os efeitos da morte celular pela irradiação (Carlson, Grogan et al. 2009), pois, parece induzir sensibilidade à irradiação (Robins, Lassman et al. 2009).

Já foram descritas linhagens de GBM humano radioresistentes, como as linhagens U-138 MG e U-251 MG (McLaughlin, Annabi et al. 2006; Zheng, Morgan-Lappe et al.

2008), e radiosensíveis, como a linhagem M059J (Hoppe, Jensen et al. 2000; Virsik-Kopp, Rave-Frank et al. 2003; Daido, Yamamoto et al. 2005). Esta última não apresenta a subunidade catalítica da DNA-PK_{CS}; já a linhagem M059K, estabelecida a partir do mesmo glioblastoma humano, apresenta a DNA-PK, e em contrapartida é radioresistente (Virsik-Kopp, Rave-Frank et al. 2003).

A identificação dos mecanismos que levam a radioresistência das células de glioma torna-se essencial para o desenvolvimento de terapias combinadas contra esta condição patológica.

1.2 SISTEMA PURINÉRGICO

As purinas (ATP, ADP e adenosina) e pirimidinas (UTP e UDP) extracelulares são moléculas sinalizadoras que apresentam diversos efeitos sobre muitos processos biológicos, incluindo neurotransmissão, contração muscular, secreção, resposta imunológica, inflamação, agregação plaquetária, dor, modulação da função cardíaca, entre outros (Burnstock 2006). Nucleotídeos extracelulares exercem ainda uma função adicional mais sutil, como moduladores negativos da imunidade ou imunodepressores (Di Virgilio, Ceruti et al. 2009), desempenhando um papel pró-inflamatório que envolve a expressão de moléculas de adesão e a secreção de várias citocinas e quimiocinas (Boeynaems and Communi 2006).

Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas, denominadas ectonucleotidases, que estão localizadas na superfície celular, podendo também estar presentes no meio intersticial ou nos fluídos corporais (Zimmermann 2006).

Os diversos e complexos efeitos tróficos exercidos pelos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares ativam a ampla família de receptores purinérgicos (Verkhatsky, Krishtal et al. 2009). Existem duas principais famílias de receptores purinérgicos: receptores de adenosina ou P1 e os receptores P2, que têm alta afinidade por nucleosídeos di- e trifosfatados (ATP, ADP, UTP, e UDP), de acordo com a estrutura molecular, bioquímica e caracterização farmacológica (Figura 1). Os receptores P1/Adenosina são acoplados à proteína G e se subdividem em 4 subtipos, A₁, A_{2A}, A_{2B}, e

A₃ (Burnstock 2004; White and Burnstock 2006; Zimmermann 2006; Verkhratsky, Krishtal et al. 2009).

Os receptores metabotrópicos P2Y são também acoplados à proteína G e já foram identificados oito membros dessa família (P2Y_{1,2,3,4,6,11,12,13} e 14) (Burnstock 2006; White and Burnstock 2006). Esses receptores podem ativar a fosfolipase C (consequentemente liberando cálcio intracelular) ou, afetar a adenilil ciclase e alterar os níveis de cAMP (Burnstock 2004).

Os receptores purinérgicos P2X são ionotrópicos e estão expressos em todas as células vivas e tecidos de vertebrados (Kim, Jiang et al. 2001; Verkhratsky, Krishtal et al. 2009). Como estão diretamente ligados a canais iônicos induzem o influxo de sódio e cálcio, ativando cascatas de sinalização intracelulares dependentes de cálcio, e o efluxo de potássio (White and Burnstock 2006; Wei, Ryu et al. 2008; Stagg and Smyth 2010).

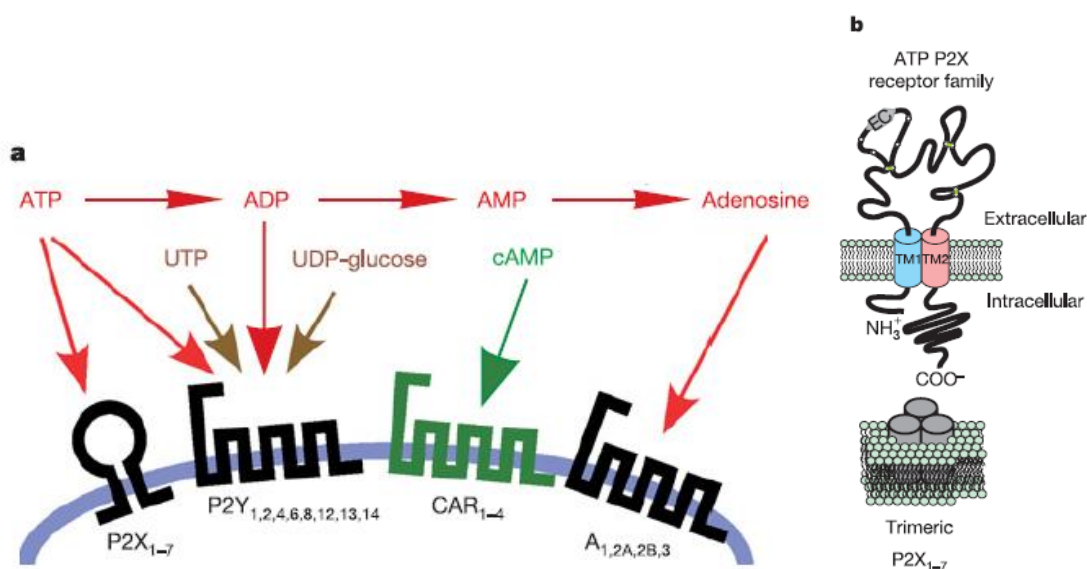


Figura 1. Sistema Purinérgico. (a) Receptores para nucleotídeos extracelulares. O ATP é convertido em adenosina 5'-difosfato (ADP), adenosina 5'-monofosfato (AMP) e adenosina por ecto-enzimas de diversas classes. Estas são as enzimas nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), ecto-fosfatase alcalina e ecto-5'-nucleotidase. Receptores purinérgicos em vertebrados (preto) incluem P2X, P2Y e receptores de adenosina (P1). O ATP atua no P2X e sobre alguns receptores P2Y (associado à proteína G); alguns receptores P2Y são ativados por ADP, uridina 5'-trifosfato (UTP) e uridina 5'-difosfato (UDP)-glicose. A adenosina atua em quatro receptores de adenosina. Em *Dictyostelium* (verde), a adenosina 5'-monofosfato cíclica (cAMP) atua em uma família de quatro receptores cAMP (CAR). (b) Representação, em desenho, da subunidade dos receptores P2X ionotrópicos de mamíferos, arranjo e topologia proposta. EC, domínio extracelular; TM1-TM2, domínios transmembrana 1-2.

Adaptado de Khakh & North, 2006 (Khakh and North 2006)

O receptor P2X possui uma forma trimérica composto por diferentes subunidades (Figura 1b). Estas subunidades, codificadas por genes distintos, são classificadas em P2X₁ até P2X₇ de acordo com a ordem cronológica de clonagem (Verkhatsky, Krishtal et al. 2009) e cada subunidade tem propriedades farmacológicas e/ou fisiológicas distintas (Kim, Jiang et al. 2001). Seis subunidades homoméricas (P2X₁₋₅ e P2X₇) e seis subunidades heteroméricas (P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6} e P2X_{4/6}) foram descritas (Stagg and Smyth 2010). Os receptores P2X têm um EC₅₀ ~ 1 – 10 µM, exceto para o P2X₇ que precisa de concentrações maiores para ser ativado (Abbracchio, Burnstock et al. 2009).

1.2.1 Receptor P2X7

O receptor P2X₇ possui várias características que o distinguem de outros membros da família dos receptores P2X (Kim, Jiang et al. 2001; Stagg and Smyth 2010). Experiências de co-imunoprecipitação mostraram que este receptor possui uma única subunidade que não heteropolimeriza com outras subunidades P2X (Kim, Jiang et al. 2001). A ativação do receptor homomérico requer concentrações de ATP que são ± 10-100 vezes maiores do que as necessárias para ativar os outros receptores P2X, sua ativação plena é atingida em concentrações em milimolar de ATP (Kim, Jiang et al. 2001; Verkhatsky, Krishtal et al. 2009). Além disso, este receptor possui uma cauda carboxi-terminal maior do que os outros P2XR e uma série de polimorfismos (Stagg and Smyth 2010).

O ATP é 10⁶ vezes mais concentrado no citosol do que no meio extracelular (milimolar *versus* nanomolar). Em tecidos saudáveis, o ATP é quase exclusivamente localizado intracelularmente, enquanto que a concentração extracelular em condições basais é insignificante (entre 10-100 nM). Portanto, pode-se supor que nestas condições a maioria dos receptores P2 dependentes de ATP está inativa (Di Virgilio, Ceruti et al. 2009).

Baixas concentrações de ATP ativam os canais iônicos do P2X₇ para tornar-se permeável aos íons de pequeno porte, enquanto que, quando exposto a altas concentrações de ATP ou, durante um longo período, pode ter seu canal iônico convertido em um grande poro transmembrana não-seletivo que permite a passagem não

só de cátions, mas também de moléculas pequenas de até 900 dáltons de tamanho (Figura 2), que em última análise, causa a morte celular (White and Burnstock 2006; Stagg and Smyth 2010). Embora o receptor P2X7 medeie também a liberação de ATP pelo seu canal, o mecanismo de liberação ainda não foi descoberto (Ohshima, Tsukimoto et al. 2010).

A ativação do receptor P2X7 leva a um rápido acoplamento ao citoesqueleto. Esta ativação é fundamentalmente diferente da observada para outros canais iônicos, pois se iniciam vários processos celulares adicionais. Estes incluem alterações na morfologia da célula, liberação de IL-1 β , ativação do fator transcricional NF- κ B, ativação da fosfolipase D, apoptose (Kim, Jiang et al. 2001) mediada por caspases e/ou necrose (Bianco, Colombo et al. 2009) – a morte celular induzida pela ativação do receptor P2X7 é altamente dependente do tipo celular (Tamajusuku, Villodre et al. 2010).

A idéia de um receptor de membrana celular ligado à apoptose é um alvo atraente para a terapia tumoral (White and Burnstock 2006).

1.2.2 Gliomas, Receptor P2X7 e Irradiação

O cérebro possui receptores purinérgicos, consequentemente, apresenta sensibilidade ao ATP e a seus análogos (Verkhatsky, Krishtal et al. 2009). Áreas de necrose e hemorragia presentes no GBM representam uma fonte constante de nucleotídeos para o crescimento tumoral (Morrone, Jacques-Silva et al. 2003). Portanto células de glioma tanto secretam como respondem ao ATP extracelular (Jantaratnotai, Choi et al. 2009). Vários estudos relatam que a expressão do receptor P2X7 está superativada em condições patológicas (Wei, Ryu et al. 2008).

Como resultado da ligação do ATP ao receptor P2X7, células de glioma humano em cultura apresentaram progressão no ciclo celular (Morrone, Jacques-Silva et al. 2003) e produção e liberação celular de numerosos fatores inflamatórios (Wei, Ryu et al. 2008; Di Virgilio, Ceruti et al. 2009; Verkhatsky, Krishtal et al. 2009) como quimiocinas e citocinas que recrutam a microglia ajudando a sustentar o crescimento do tumor (Jantaratnotai, Choi et al. 2009).

Células de glioma humano mostraram-se resistentes a morte induzida pelo ATP em altas concentrações (5 mM) e pelo BzATP (agonista seletivo do receptor P2X7; 100 μ M) após 24h, enquanto que em culturas organotípicas o mesmo tratamento induziu a morte celular. Esses dados indicam que o ATP liberado nessas situações pode induzir a morte celular do tecido normal em torno do tumor, abrindo espaço para o rápido crescimento e invasão do tumor (Morrone, Horn et al. 2005). Uma possível explicação para a resistência a morte via ATP-P2X7 apresentada por essas células pode ser uma mutação na região C-terminal do receptor, que tem um papel crucial para a formação do poro, mas não na função do canal; conseqüentemente, causando a falta da indução de apoptose (Cheewatrakoolpong, Gilchrest et al. 2005; Bianco, Colombo et al. 2009; Adinolfi, Cirillo et al. 2010).

Já outro estudo caracteriza a linhagem GL261 de glioma de camundongo como sensível ao ATP. As células mais sensíveis apresentaram uma maior expressão do receptor P2X7 (Tamajusuku, Villodre et al. 2010), sendo esta outra possível explicação para a resistência a altas concentrações de ATP apresentada por algumas linhagens de glioma.

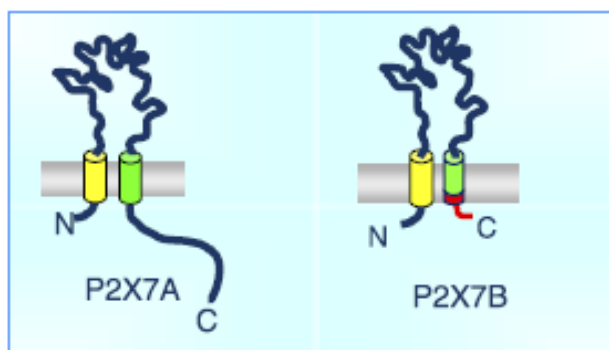


Figura 2. Topologia do receptor P2X7A e P2X7B (truncado) na membrana. Amarelo, TM1; verde, TM2; vermelho 18 aminoácidos extras presentes no C-terminal do receptor P2X7B. Adaptado de Adinolfi et al., 2010 (Adinolfi, Cirillo et al. 2010).

Além do mais, o catabolismo do ATP é extremamente baixo nestas células tumorais, em comparação com astrócitos normais, devido a uma redução acentuada na expressão e atividade das enzimas que degradam ATP (ecto-nucleotidases). A depleção de ATP parece levar à redução do tamanho do glioma, com alteração das características

dos tumores invasivos em um modelo animal de glioma (Morrone, Oliveira et al. 2006). Nosso grupo tem proposto que a baixa atividade E-NTPDásica em gliomas poderiam favorecer o acúmulo de ATP no interstício do tumor e a sua progressão (Wink, Lenz et al. 2003; Morrone, Oliveira et al. 2006).

Descobertas recentes mostram que a irradiação induz à liberação de ATP via receptor P2X7 (Ohshima, Tsukimoto et al. 2010), levantado a hipótese de uma possível participação do receptor P2X7 na morte celular induzida pela irradiação.

1.3 INFLAMAÇÃO E CÂNCER

Células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos e linfócitos estão presentes na maioria dos tumores sólidos. Estas células mediadoras das respostas inflamatórias são necessárias tanto para a progressão do tumor quanto para a eliminação deste (Maniati, Soper et al. 2010). Diversos estudos vêm ampliando o conceito de que a inflamação é um componente crítico de progressão tumoral (Zou and Restifo 2010).

Já foi descrita a presença de células apresentadoras dos antígenos e células T CD4⁺ nos glioma. Este dado é particularmente relevante uma vez que os tumores que se formam no SNC são “protegidos” da imunidade mediada por células T, o que é provavelmente atribuído à falta de um sistema linfático e à presença da barreira hematoencefálica no SNC (Wainwright, Sengupta et al. 2010). Atualmente, o SNC é descrito como "imunologicamente especializado", após evidências de interações sistema imune-SNC em doenças como esclerose múltipla, encefalite auto-imune experimental e tumores cerebrais (Okada, Kohanbash et al. 2009).

Pacientes com GBM desenvolvem espontaneamente respostas imunes antitumorais através de vários mecanismos que o permitem escapar ou superar o sistema imunológico, ou ainda, usá-lo a seu favor (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010; Szabo and Carpentier 2011). O glioma parece sintetizar e secretar vários fatores que são capazes de inibir a resposta das células T. Estes incluem fator de transformação do crescimento (TGF- β), prostaglandina E2 (PGE2), interleucina-10 (IL-10) e gangliosídeos (Okada, Kohanbash et al. 2009). Uma maior atenção tem sido dada ao microambiente ao redor do

tumor, que é composto por uma combinação variável de células tumorais, células do sistema imunológico, células inflamatórias, células endoteliais e matriz extracelular (Iwami, Natsume et al. 2011). Neste ambiente, as células inflamatórias parecem exercer um papel fundamental no processo de proliferação, sobrevivência e migração da neoplasia (Coussens and Werb 2002; Zou and Restifo 2010). Estes estudos mostram a necessidade de uma indução exógena do sistema imunológico para gerar uma resposta antitumoral. Novas abordagens imunoterápicas estão sendo desenvolvidas com este foco (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010). Ensaios clínicos que testaram a infusão de células imunes autólogas ativadas, ou imunoterapia ativa com antígenos tumorais e células dendríticas obtiveram sucesso na indução da imunidade antitumoral e ainda, alguma melhora na resposta à irradiação (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010; Szabo and Carpentier 2011).

A produção de citocinas atua como um meio de comunicação no microambiente tumoral. Células do sistema imunológico são a principal fonte de citocinas, mas muitas outras células humanas também são capazes de produzi-las. Citocinas podem ser classificadas nas seguintes categorias: interleucinas (IL), fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônias, interferons (IFN) (α , β e γ), fator de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas. Estas citocinas podem ter tanto atividade pró ou anti-inflamatória e atividade imunossupressora, dependendo do microambiente (Iwami, Natsume et al. 2011).

A interação entre citocinas e seus receptores resulta na formação de uma rede de interação no local do tumor, que é primariamente responsável pela progressão de tumores em geral, mas também pela disseminação de respostas imunes antitumorais e pela indução da rejeição tumoral (Iwami, Natsume et al. 2011).

Os diferentes tipos de tratamento do câncer como a radioterapia e quimioterapia induzem à liberação de citocinas que podem mediar sintomas tóxicos tanto no órgão-específico quanto sistêmico (Seruga, Zhang et al. 2008).

1.3.1 Interleucina-17 (IL-17)

A interleucina-17 (IL-17, também conhecida como IL-17A) pertence a uma família de seis membros (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e 17F). O produto humano do gene da IL-17A é uma glicoproteína homodimérica de 155 aminoácidos com um peso molecular de 35 kDa (Moseley, Haudenschild et al. 2003; Ivanov and Linden 2009).

Esta citocina tem sido alvo de grande interesse devido à descoberta de que a produção de IL-17 caracteriza um novo subconjunto de células T *helper* CD4⁺ (células T_h17) (Zou and Restifo 2010). Estudos realizados com células humanas indicam que outros tipos de células, além da T_h17, também podem ser fonte da IL-17 sob certas condições, como as células CD8, T $\gamma\delta$ e natural killer invariante (NKi) (Gaffen 2009; Ivanov and Linden 2009).

A IL-17 é caracterizada como uma citocina pró-inflamatória (Kehlen, Thiele et al. 1999; Ivanov and Linden 2009), envolvida na imunidade inata e adaptativa (Kawaguchi, Adachi et al. 2004; Gaffen 2009; Ivanov and Linden 2009), que induz à liberação secundária de quimiocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento na maioria das principais células mesenquimais para o recrutamento e acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório (Figura 3) (Ivanov and Linden 2009).

O receptor para IL-17A (IL-17R) é uma proteína transmembrana de passagem única de aproximadamente 130 kDa. Este receptor se expressa em todos os tecidos examinados até o momento (Kehlen, Thiele et al. 1999; Moseley, Haudenschild et al. 2003).

Após a ligação da IL-17 ao seu receptor (complexo IL-17/R) em células mesenquimais, a sinalização intracelular inclui pelo menos dois caminhos. Um deles envolve a proteína adaptadora, NF- κ B, ativada pela Act-1 (Ivanov and Linden 2009). O NF- κ B está sendo considerado um dos fatores de transcrição mais importantes na regulação da função das células neuronais e gliais. Essa ativação pela IL-17 leva à expressão coordenada de vários genes que codificam proteínas envolvidas na síntese de mediadores inflamatórios e ainda na ampliação e perpetuação da resposta inflamatória (Kehlen, Thiele et al. 1999; Kawaguchi, Adachi et al. 2004).

A outra via, descrita recentemente em células epiteliais respiratórias humanas, é independente de Act-1 e envolve a Janus-quinase (JAK)1 e a PI3K, seguida pela inativação da glicogênio sintase quinase (GSK)-3 β , ativação do gene e secreção de citocinas (Gaffen 2009; Ivanov and Linden 2009).

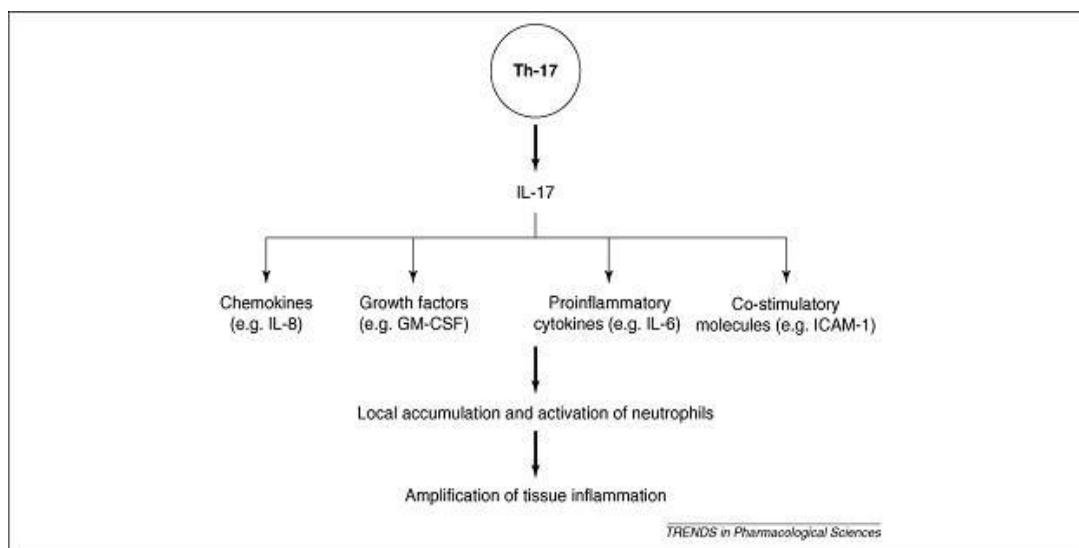


Figura 3. IL-17 como reguladora de citocinas na resposta imune de mamíferos. Produzida predominantemente por células T_H17, a IL-17 induz a produção de quimiocinas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias em células do estroma mesenquimal. Isto por sua vez, leva ao recrutamento e ativação de neutrófilos localmente e, assim ao aumento da inflamação do tecido.

GM-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos.

ICAM-1: molécula de adesão intracelular.

Adaptado de Ivanov & Lindén, 2009 (Ivanov and Linden 2009).

1.3.2 Gliomas, Interleucina-17 e Irradiação

Recentemente, confirmou-se a presença da IL-17A em gliomas de humanos e camundongos (Wainwright, Sengupta et al. 2010). Além disso, o mRNA do receptor da IL-17 se mostrou constitutivamente expresso em células de GBM e esta citocina estimula a expressão de I κ B α e a secreção de IL-6 e IL-8 nas células de GBM (Kehlen, Thiele et al. 1999).

Entretanto, os resultados em relação a uma atividade pró ou antitumoral da IL-17 não são unânimes. Esses resultados heterogêneos podem ser, em parte, devido a dose da IL-17 em cada um dos estudos. A concentração de IL-17 exógena pode ser diferente da

concentração da IL-17 endógena, que é produzida pelas células T_H17 e outras. Portanto, provavelmente a atividade biológica da IL-17 exógena em relação à endógena não é idêntica (Zou and Restifo 2010).

Estudos atuais mostram que o aumento da IL-17 no microambiente tumoral, por mecanismos dependentes de células T, inibe o crescimento das células tumorais e aumenta a sobrevivência em modelos murinos de câncer pancreático e hematopoiético (Benchetrit, Ciree et al. 2002; Gnerlich, Mitchem et al. 2010). Reforçando esta ideia, Ma e colaboradores (2011) mostraram que o efeito antitumoral de células T infundidas no tumor foi perdido quando elas deixaram de expressar IL-17A (Ma, Aymeric et al. 2011). Outro estudo recente demonstrou que a expressão induzida de IL-17 nas células tumorais suprime a progressão do tumor (Zou and Restifo 2010). Um estudo de Hu e colaboradores (2011) mostra que não há diferença significativa na concentração de IL-17 sérica de pacientes com glioma e doadores saudáveis, apresentando uma concentração entre 5-10 pg/ml (Hu, Mao et al. 2011). Esses estudos sustentam um papel antitumoral da IL-17 quando esta citocina está presente no microambiente tumoral, provavelmente, em concentrações maiores que a concentração endógena. Entretanto, ainda não há estudos mostrando o efeito direto da IL-17 exógena sobre o GBM.

A irradiação pode levar à liberação de citocinas em vários tecidos (Seruga, Zhang et al. 2008). Uma pesquisa estabelece a IL-17A como sendo uma citocina de resposta das células hematopoiéticas a lesão induzidas por irradiação em camundongos (Tan, Huang et al. 2006). Atualmente, fármacos baseados em citocinas e anti-citocinas estão tendo um papel crucial no tratamento de gliomas malignos (Iwami, Natsume et al. 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Considerando que o receptor purinérgico P2X7 tem sido amplamente descrito em gliomas (Jantaratnotai, Choi et al. 2009) e que ainda não há relatos publicados descrevendo ao efeito da IL-17 em células de glioblastoma humano, bem como, sobre a possível relação dos itens anteriores com um dos tratamentos padrão dos gliomas, a irradiação (Van Meir, Hadjipanayis et al. 2010), este estudo teve como objetivo investigar a possível relação do receptor purinérgico P2X7 e da interleucina-17 com a irradiação e uma possível interação destas duas vias em linhagens de glioma humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a linhagem de glioma M059J (radiossensível) quanto à sensibilidade à morte induzida pelo ATP-P2X7R, comparando com as linhagens U-138 MG e U-251 (radioresistentes).
- Estudar a relação da ativação do receptor P2X7 com a resposta à irradiação em linhagens de glioma humano.
- Avaliar a ação da irradiação na expressão do receptor P2X7 e do receptor da IL-17 nas linhagens de glioma humano M059J e U138-MG.
- Investigar a ação da IL-17 exógena na viabilidade celular de linhagens de glioma humano.
- Investigar uma possível interação entre o receptor de IL-17 e o receptor P2X7 em linhagens de glioma humano.

3 RESULTADOS

3.1 CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO

*P2X7 RECEPTOR ACTIVATION LEADS TO INCREASED CELL DEATH IN A
RADIOSENSITIVE HUMAN GLIOMA CELL LINE*

Artigo submetido ao periódico *Purinergic Signalling*

P2X7 RECEPTOR ACTIVATION LEADS TO INCREASED CELL DEATH IN A RADIOSENSITIVE HUMAN GLIOMA CELL LINE

¹Gehring, M.P., ²Pereira T.C.B., ¹Zanin R.F., ³Filho A.B., ⁴Lenz G., ⁵Battastini A.M.O., ²Bogo M.R., ⁶Campos M.M., ^{1,6}Morrone F.B.

¹Laboratório de Farmacologia Aplicada, PUCRS, Porto Alegre, RS – Brazil. ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), PUCRS, Porto Alegre, RS – Brazil. ³Serviço de Radioterapia, Hospital São Lucas, Porto Alegre, RS – Brazil. ⁴Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, UFRGS, Porto Alegre, RS - Brazil. ⁵Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. ⁶Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, RS – Brazil.

Abstract

Gliomas are the most lethal tumors of CNS and ATP is an important signaling molecule in CNS and it is a selective P2X7 purinergic receptor ligand at high concentrations. Some studies have reported that P2X7R is responsible for ATP-induced cell death in various cell types. Herein, we investigated whether the activation of P2X7R might be implicated in death of a radiosensitive human glioma lineage. The radioresistant human glioma cells U-138 MG and U-251 MG and the radiosensitive human glioma lineage M059J were used. The effects of P2X7R agonists (ATP and BzATP) and irradiation (2 Gy) in glioma cells were analyzed by MTT assay, annexin V/PI flow cytometry and P2X7R mRNA expression was assessed by qRT-PCR. The human glioma cell lines U-138 MG and U-251 MG were resistant to death when treated with either ATP (5 mM) or BzATP (100 μ M), whereas in the radiosensitive M059J glioma cell line, the high ATP concentration (5 mM) or the selective P2X7R agonist BzATP significantly diminished the cell viability ($32.4\% \pm 4.1$ and $24.6\% \pm 4.0$, respectively). The M059J lineage expresses significantly higher P2X7R levels when compared to the U-138 MG and U-251 cell lines (0.40 ± 0.00 ; 0.28 ± 0.01 and 0.31 ± 0.01 , respectively) and irradiation upregulated P2X7R expression (0.55 ± 0.08) in this lineage. Additionally, the selective P2X7R antagonist A740003 significantly decreased the cell death caused by irradiation. We provide novel evidence indicating that M059J human glioma cell line is ATP-P2X7R sensitive, pointing out the relevance of the purinergic P2X7 receptors in glioma radiosensitivity.

Key words: P2X7 receptor; glioma; irradiation; ATP; radiosensitivity.

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive type of all primary brain tumors, with an overall median survival of less than one year after diagnosis (Meijer et al., 2009). These tumors show a high proliferation rate, variability in tumor histopathology and diffusely infiltrate adjacent brain tissue, making surgical resection and radiotherapy limited (Tamajusuku et al., 2010). Radiotherapy confers some survival advantages, but the resistance of the tumor cells to the effects of irradiation limits the treatment success (Daido et al., 2005).

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) plays many important roles in the central nervous system (CNS), especially in modulating neurotransmission via two families of purinergic receptors, P2Y and P2X (Sun, 2010). A peculiar member of the ionotropic P2X receptor family is the P2X7 receptor subtype (P2X7R). When this receptor is activated by ATP binding, it opens a pore through which molecules up to 900 Da can pass. However, this pore opening requires prolonged exposure to ATP, and the full activation is reached only at millimolar (mM) ATP concentrations (Verkhatsky et al., 2009; Tamajusuku et al., 2010). Some studies have reported that P2X7 is responsible for ATP-induced cell death in various cell types through mechanisms involving necrotic features such as swelling, loss of membrane integrity and also apoptotic features, such as shrinking and phosphatidylserine externalization (Morrone et al., 2005; Wei et al., 2008; Tamajusuku et al., 2010). Considering the internal concentration of ATP, which ranges from 5 to 10 mM in most cells, cell death potentially elevates the extracellular concentrations of ATP to mM levels, similar to the concentrations that induced cell death in organotypic cultures (Morrone et al., 2005).

The extracellular ATP present in the space around the brain tumors can be released by the excitotoxic death of the normal host cells around the tumor or at the moment of the surgical tumor resection (Morrone et al., 2005). Another extracellular source of ATP on brain tumors was recently shown: the γ -irradiation, which evokes ATP release and P2X7R activation (Ohshima et al., 2010).

This study was aimed to investigate whether P2X7R is related to death of radiosensitive human glioma cell line. For this purpose, the effect of extracellular ATP was compared in human glioma cell lines U-138 MG and U-251 MG, which are radioresistant (McLaughlin et al., 2006; Zheng et al., 2008) with the human glioma

lineage M059J, sensitive to irradiation (Hoppe et al., 2000; Virsik-Kopp et al., 2003; Daido et al., 2005).

Methods and Materials

Compounds

A740003 was obtained from Tocris (Ellisville, MO, USA); *adenosine 5'-triphosphate* (ATP) and *benzoyl adenosine 5'-triphosphate* (BzATP) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A); suramin was obtained from RBI (Natick, Mass., USA) and RB2 was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Cell lines and cell culture

The U-138 MG, U-251 MG and M059J human glioblastoma cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC – Rockville, Maryland, USA). Cells were cultured in DMEM/15% FBS at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air.

Cell viability

Glioma cells were seeded at 7×10^3 cells per well in 96-well plates and grown for 24 h. The cells were treated with ATP (0.5, 3 and 5 mM) or with BzATP (100 µM). M059J cells were pre-treated with the selective P2X7R antagonist A740003 (10 µM) (Honore et al., 2006; Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007) or with the two non-selective P2 receptor antagonists suramin (30 µM) or RB2 (100 µM), and after 20 min with ATP (5 mM) for 24 h. At the end of this period, the medium was removed, the cells were washed with *calcium-* and *magnesium-free* (CMF) and 100 µl of MTT solution (MTT 5 mg/ml in PBS in 90% DMEM/10% FBS) was added to the cells and incubated for 3 h. The formazan crystals, formed by tetrazolium cleavage, were dissolved with 100 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) for 10 min and quantified in Spectra Max M2e (Molecular Devices) at 595 nm. This absorbance was linearly proportional to the number of live cells with active mitochondria. The cell viability was calculated using Eq. (1):

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{Abs}_s / \text{Abs}_{\text{control}})100$$

where Abs_s is the absorbance of cells treated with different formulations and $Abs_{control}$ is the absorbance of control cells (incubated with cell culture medium only).

Gamma irradiation

The cells were gamma irradiated at a 2 Gy dose using a Cobalt Theratron Phoenix (Philips, Eindhoven, The Netherlands), at a source-to-target distance of 70 cm (Hoppe et al., 2000). All irradiation experiments were performed with confluent cells kept in cell culture medium (Virsik-Kopp et al., 2003). The treatments were performed 24 h before irradiation. Irradiation was undertaken at the Radiotherapy Service, Hospital São Lucas, PUCRS.

Cell counting

Glioma cells were seeded at 18×10^3 cells per well in 24-well plates. On the second day, the cells were treated with ATP (5 mM) or irradiation (2 Gy). The M059J cells were co-treated with the selective P2X7R antagonist A740003 (10 μ M), and then irradiated. After 24 h, the medium was collected and 200 μ l of trypsin/EDTA solution was added to detach the cells, which were counted in hemocytometer.

Analysis of mRNA expression

Glioma cells were seeded at 2×10^5 cells per well in 6-well plates and grown for 24 h. The cells were irradiated (2 Gy), control cells were not irradiated; after 24 h the total RNA was isolated with Trizol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The total RNA was quantified by spectrophotometry and the cDNA was synthesized with ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) from 1 μ g total RNA, in accordance with the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using SYBR Green I (Invitrogen) to detect double-strand cDNA synthesis. Reactions were done in a volume of 25 μ L using 12.5 μ L of diluted cDNA (1:50), containing a final concentration of 0.2 \times SYBR Green I (Invitrogen), 100 μ M dNTP, 1 \times PCR Buffer, 3 mM $MgCl_2$, 0.25 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 200 nM of each reverse and forward primers (Table 1) (Ben Yebdri et al., 2009; Rho et al., 2010). The PCR cycling conditions were: an initial polymerase activation step for 5 min at 94°C, 40 cycles of 15 s at 94°C for denaturation, 10 s at 60°C for annealing and 15 s at 72°C for elongation.

At the end of cycling protocol, a melting-curve analysis was included and fluorescence measured from 60 to 99°C. Relative expression levels were determined with 7500 Fast Real-Time System Sequence Detection Software v.2.0.5 (Applied Biosystems). The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR 11.0 Software (<http://LinRegPCR.nl>). Relative RNA expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The stability of the reference genes 18S, β -actin, B2M, GAPDH (*M-value*) and the optimal number of reference genes according to the pairwise variation (*V*) were analyzed by GeNorm 3.5 Software (<http://medgen.ugent.be/genorm/>).

Annexin V/PI flow cytometry staining technique

M059J glioma cells were seeded at 2×10^5 cells per well in 6-well plates and grown for 24 h. The cells were treated with P2X7R agonist, antagonist or/and irradiation for 24 h. Dead cells were quantified by annexin V-FITC–propidium iodide (PI) double staining, using Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) 24 h after treatment, according to the manufacturer's instructions. Experiments were performed on BD FACSCanto II flow cytometer and the results were analyzed using FlowJo Software (Tree Star).

Statistical analysis

The number of experimental replications is given in the figure legends; replicate experiments were conducted with cultures from different seeding. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer test, or by Student's *t*-test using GraphPad Software (San Diego, CA, U.S.A.). *p* values < 0.05 were taken to indicate statistical significance.

Results

Cell viability

In this study, we tested the effect of irradiation and purinergic ligands in different glioma cell lines. Cell viability was not altered when the human glioma cell lines U-138 MG and U-251 MG were treated with either ATP (5 mM) or BzATP (100 μ M) (Fig. 1a-b). Otherwise, the treatment with a high ATP concentration (5 mM) or the selective P2X7R agonist BzATP (100 μ M), significantly diminished the cell viability ($32.4\% \pm 4.1$ and $25.6\% \pm 3.3$, respectively) of M059J glioma cell line (Fig. 1c). The

ATP resistance of U-138 MG lineage has been already described by our group (Morrone et al., 2005), and a similar pattern of resistance was observed in this study with U-251 MG cells, contrasting with ATP sensitivity exhibited by the M059J cell line.

Next, we investigated whether ATP-induced cytotoxicity in M059J cell line might be related to the activation of P2X7R. As shown in the Fig. 1d, the selective P2X7R antagonist A740003 (10 μ M) partially prevented the cytotoxicity caused by 5 mM ATP (from 32.4% to 19.6%), indicating that this receptor is probably implicated in the cytotoxic effects displayed by ATP. However, both non-specific P2 receptor antagonists (suramin and RB2) failed to reverse the effects of ATP. Indeed, the treatment with suramin (30 μ M) plus ATP (5 mM) significantly reduced the cell viability ($61.1\% \pm 2.77$) when compared to the treatment with ATP (5 mM) alone (Fig. 1d).

Cell counting

As shown in Fig. 2a-b, the treatment with ATP (5mM), irradiation at 2 Gy or irradiation plus ATP (5mM) did not affect the U-138 MG and U-251 MG glioma cell number, which indicate an absence of effect on cell proliferation. Interestingly, these same treatments led to significant reductions in the percentage of cell number of the M059J cell line (Fig. 2c), $44.6\% \pm 5.3$ for ATP (5 mM), $24.0\% \pm 3.62$ for irradiation and $69.2\% \pm 9.21$ for irradiation plus ATP treatment. This data supports that M059J cells are radiosensitive, whereas U-138 MG and U-251 MG cell lines are radioresistant (Hoppe et al., 2000; Virsik-Kopp et al., 2003; Daido et al., 2005; McLaughlin et al., 2006; Zheng et al., 2008). These results are in agreement with the data presented in Fig. 1 demonstrating that human glioma cell line M059J is more sensitive to high ATP concentration than U-138 MG and U251-MG human glioma cell lines. Noteworthy, co-treatment with irradiation plus ATP (5 mM) increased the reduction of cell counting on glioma cell line M059J (Fig. 2c), in comparison to irradiation only, indicating that ATP has an additional effect on cell depletion induced by the irradiation on radiosensitive glioma cells.

To determine if P2X7R might be related to the radiosensitivity of the M059J cells, this lineage was co-treated with the selective P2X7R antagonist A740003 (10 μ M), and then irradiated (2 Gy). As shown in Fig. 2c, the A740003 completely reversed the cell number decrease caused by irradiation (2 Gy) (from $76.0\% \pm 3.62$ of cells to

105.3% \pm 1.79), clearly indicating that P2X7R is involved in the radiosensitivity of M059J human glioma cells. As described before, the irradiation induces ATP release (Ohshima et al., 2010), wherefore the A740003 antagonist probably blocks the effect of nucleotide released by irradiation.

Analysis of mRNA expression

To determine the reference genes to be used in the present study, we analyzed the stability of β -actin, 18s, B2M and GAPDH based on previous reports of housekeeping genes (Rho et al., 2010). The most stable reference genes were 18s, B2M and GAPDH, whereas β -actin was the less stable. We also analyzed the optimal number of internal control genes for normalization with geNorm. The results indicated the combination of the three or four most stable genes for normalization purposes. As β -actin gene was found very unstable, we chose to use the other three constitutive genes for normalization (data not shown).

The expression of P2X7R in U-138 MG, U-251 MG and M059J cells exposed to control (standard cell culture medium alone) was analyzed and representative results are presented in Fig. 3a. The M059J lineage expressed significantly higher P2X7R levels when compared to U-138 MG and U-251 cell lines (0.40 ± 0.00 , 0.28 ± 0.01 and 0.31 ± 0.01 , respectively), possibly accounting to the response of ATP via P2X7R and in part to the radiosensitivity of M059J lineage. As shown in Fig. 3b, the treatment with irradiation (2 Gy) caused a marked increase in P2X7R expression in M059J cells, in comparison to non-irradiated control cells (37.5%, from 0.40 ± 0.00 to 0.55 ± 0.08), what probably turns M059J cells more sensitive to the released ATP induced by irradiation (Ohshima et al., 2010).

Annexin V/PI flow cytometric staining technique

As shown in Fig. 4c, the treatment with ATP (5 mM) induced a clear increase in annexin V-positive population ($32.9\% \pm 7.30$), and the selective P2X7R antagonist A740003 (10 μ M), significantly reduced the annexin V-positive population in 32.8% ($10.8\% \pm 2.95$) (Fig. 4d). As shown in Fig. 4e, the irradiation (2 Gy) also caused an increase in the annexin V-positive population ($21.7\% \pm 1.42$) and A740003 was able to partially reverse this parameter in 50.2% ($10.9\% \pm 0.75$) (Fig. 4f).

In order to determine if irradiation might turn M059J cells more sensitive to ATP, and also to confirm if the receptor is still functional after irradiation at 2 Gy, we irradiated these cells and after we treated them with ATP (5 mM) or with A740003 (10 μ M) plus ATP (5 mM). As shown in Fig. 4g, the treatment with ATP after irradiation revealed that annexin V-positive population significantly increased ($48.0\% \pm 7.00$) when compared to irradiation only, showing that cells become more sensitive to ATP after irradiation. The Fig. 4h shows that A740003 was able to significantly reverse ($13.5\% \pm 1.50$) the effect of irradiation plus ATP.

Discussion

In the present study, we show that radioresistant U-138 MG and U-251 MG human glioma cells are also resistant to death caused by the P2X7R agonists ATP and BzATP (Fig. 1a-b and Fig. 2a-b). On the other hand, the radiosensitive M059J human glioma cell was found to be responsive to death provoked by ATP via P2X7R (Fig. 1c, Fig. 2c and Fig 4c). Our data establish a possible relationship between human glioma cells radiosensitivity and P2X7R activation and expression (Fig. 2c, 3b and 4f-h).

A possible explanation to ATP-resistance by U-138 MG and U-251 MG can be a mutation in the P2X7R since some studies on human P2X7R have identified polymorphisms (Cheewatrakoolpong et al., 2005) that even high ATP concentrations fail to trigger pore formation and apoptosis (Adinolfi et al., 2010). Another possible reason is provided herein: both U-138 MG and U-251-MG cell lines display significantly less P2X7R expression in relation to M059J cells (Fig 3a). In fact, Tamajusuku and collaborators (2010) have shown a positive correlation between ATP-induced cell death and the increase in P2X7R expression (Tamajusuku et al., 2010). Additionally, a multi-centric study showed that patients that have gliomas with high P2X7R expression present longer survival, when compared to patients with gliomas expressing lower P2X7R levels (2008). The resistance of the glioma cells to the effects of irradiation limits the success of the treatment (Daido et al., 2005) and the identification of the molecular mechanisms underlying GBM radioresistance is essential for development of combination therapies against this lethal pathology (McLaughlin et al., 2006).

The P2X7R is upregulated after acute brain injury (Kim et al., 2010), as irradiation. Herein, we found that the P2X7R expression in M059J cells significantly increased when this cell line was irradiated (Fig. 3b), leading us to believe that the activation of P2X7R induce, in part, to an inflammatory mechanism related to irradiation-induced cell death in radiosensitive lineages.

The death stimulated by ATP via P2X7R on M059J human glioma cell line has apoptotic features (Fig. 4c). Several studies have shown that cell death induced by activation of P2X7R is strongly dependent on the cell type (Tamajusuku et al., 2010) and the idea of a cell-membrane receptor linked to apoptosis is an attractive target for cancer therapy (White and Burnstock, 2006).

The cell death induced by ionizing irradiation, in general, is considered to be apoptotic (Daido et al., 2005), as we demonstrated in our study (Fig. 4e). Irradiation induces DNA doublestrand breaks (DSB), which are the most lethal form of damage to DNA. In mammals, DNA DSB is generally repaired via nonhomologous end joining, in which DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) plays a key role (Daido et al., 2005). It is already known that M059J cells lines lack DNA-PK and are sensitive to irradiation (Hoppe et al., 2000; Virsik-Kopp et al., 2003; Daido et al., 2005). In our study, we propose an additional radiosensitization mechanism, in which P2X7R activation is implicated, via apoptosis induction. Accordingly, the pharmacological inhibition of P2X7R by its selective antagonist A740003 elicited a significant decrease of irradiation-induced death (Fig. 4f), even if stimulated with more ATP after irradiation (Fig. 4h).

Recently, Ohshima et al. (2010) showed that γ -irradiation induces P2X7R-dependent ATP release from B16 melanoma cells (Ohshima et al., 2010) and Wilhelm et. al (2010) observed increased ATP concentrations after total body irradiation (Wilhelm et al., 2010). The treatment with ATP (5 mM) after irradiating induces more cell death of the ATP-sensitive cells (Fig. 4g), demonstrating that cells become more sensitive to ATP after irradiation, probably because irradiation induce ATP-release (Kim et al., 2010; Ohshima et al., 2010) and increased P2X7R expression. We surmise that this nucleotide induces, via activation of P2X7R, an apoptotic death on these cells, such as is observed for irradiation, and that P2X7R is partially related to irradiation-induced cell death.

In conclusion, we have shown, for the first time that P2X7R activation increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line and our results indicate the possible

involvement of P2X7 receptor in glioma radiosensitivity. Understanding the roles of P2X7R in glioma cells may lead to a rationale testing of novel therapeutic strategies to inhibit tumor growth.

Acknowledgments

We thank for Dr. Carlos Henrique Barrios for the gift of the cell line, Julia Cisilotto for help with the cell counting and Magali Carvalho Borges for the help with cell irradiation.

Financial Support

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) [Proc. 1016960], and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, Mastrogiannakis GM, Olson JJ, Mikkelsen T, Lehman N, Aldape K, Yung WK, Bogler O, Weinstein JN, VandenBerg S et al. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Cancer Genome Atlas Research Network.. *Nature* **455**:1061-1068.
- Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, Falzoni S, Chiozzi P, Pellegatti P, Callegari MG, Sandona D, Markwardt F, Schmalzing G and Di Virgilio F (2010) Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J* **24**:3393-3404.
- Ben Yebdri F, Kukulski F, Tremblay A and Sevigny J (2009) Concomitant activation of P2Y(2) and P2Y(6) receptors on monocytes is required for TLR1/2-induced neutrophil migration by regulating IL-8 secretion. *Eur J Immunol* **39**:2885-2894.
- Cheewatrakoolpong B, Gilchrest H, Anthes JC and Greenfeder S (2005) Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* **332**:17-27.
- Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, Sawaya R, Kondo S and Kondo Y (2005) Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. *Cancer Res* **65**:4368-4375.
- Donnelly-Roberts DL and Jarvis MF (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* **151**:571-579.
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong C, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR and Jarvis MF (2006) A-740003 [N-(1-[[[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino]-2,2-dimethylpropyl]-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **319**:1376-1385.
- Hoppe BS, Jensen RB and Kirchgessner CU (2000) Complementation of the radiosensitive M059J cell line. *Radiat Res* **153**:125-130.
- Kim JE, Ryu HJ, Yeo SI and Kang TC (2010) P2X7 receptor regulates leukocyte infiltrations in rat frontoparietal cortex following status epilepticus. *J Neuroinflammation* **7**:65.
- McLaughlin N, Annabi B, Bouzeghrane M, Temme A, Bahary JP, Moundjian R and Beliveau R (2006) The Survivin-mediated radioresistant phenotype of glioblastomas is regulated by RhoA and inhibited by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Brain Res* **1071**:1-9.
- Meijer DH, Maguire CA, LeRoy SG and Sena-Esteves M (2009) Controlling brain tumor growth by intraventricular administration of an AAV vector encoding IFN-beta. *Cancer Gene Ther* **16**:664-671.
- Meller R, Skradski SL, Simon RP and Henshall DC (2002) Expression, proteolysis and activation of caspases 6 and 7 during rat C6 glioma cell apoptosis. *Neurosci Lett* **324**:33-36.
- Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJ, Salbego CG, Lenz G and Battastini AM (2005) Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurooncol* **71**:135-140.

- Ohshima Y, Tsukimoto M, Takenouchi T, Harada H, Suzuki A, Sato M, Kitani H and Kojima S (2010) gamma-Irradiation induces P2X(7) receptor-dependent ATP release from B16 melanoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1800**:40-46.
- Rho HW, Lee BC, Choi ES, Choi IJ, Lee YS and Goh SH (2010) Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. *BMC Cancer* **10**:240.
- Sun SH (2010) Roles of P2X7 receptor in glial and neuroblastoma cells: the therapeutic potential of P2X7 receptor antagonists. *Mol Neurobiol* **41**:351-355.
- Tamajusuku AS, Villodre ES, Paulus R, Coutinho-Silva R, Battasstini AM, Wink MR and Lenz G (2010) Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *J Cell Biochem* **109**:983-991.
- Verkhatsky A, Krishtal OA and Burnstock G (2009) Purinoceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol* **39**:190-208.
- Virsik-Kopp P, Rave-Frank M, Hofman-Huther H and Schmidberger H (2003) Role of DNA-PK in the process of aberration formation as studied in irradiated human glioblastoma cell lines M059K and M059J. *Int J Radiat Biol* **79**:61-68.
- Wei W, Ryu JK, Choi HB and McLarnon JG (2008) Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells. *Cancer Lett* **260**:79-87.
- White N and Burnstock G (2006) P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* **27**:211-217.
- Wilhelm K, Ganesan J, Muller T, Durr C, Grimm M, Beilhack A, Krempf CD, Sorichter S, Gerlach UV, Juttner E, Zerweck A, Gartner F, Pellegatti P, Di Virgilio F, Ferrari D, Kambham N, Fisch P, Finke J, Idzko M and Zeiser R (2010) Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* **16**:1434-1438.
- Zheng M, Morgan-Lappe SE, Yang J, Bockbrader KM, Pamarthy D, Thomas D, Fesik SW and Sun Y (2008) Growth inhibition and radiosensitization of glioblastoma and lung cancer cells by small interfering RNA silencing of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Cancer Res* **68**:7570-7578.

Figure Legends

Figure 1. a – c) Effect of treatment with ATP (0.5, 3 and 5 mM) and BzATP (100 μ M) on cell viability of human glioma lines after 24 h. d) Effects of pre-treatment with the selective P2X7R antagonist A740003 (10 μ M) or P2R suramin (30 μ M) or P2YR RB2 (100 μ M) antagonists and ATP (5 mM) on cell viability of M059J cells after 24 h. The experiments were carried out at least three times in triplicate. Each column represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ for comparison *versus* control and ## $p < 0.01$ for comparison from the respective group, as determined by ANOVA/Tukey–Kramer test

Figure 2. Effect of treatment with ATP (5 mM), irradiation (2 Gy) or ATP and irradiation on cell number of human glioma cells a) U-138 MG, b) U-251 MG and c) M059J, which was also co-treated with A740003 (10 μ M) and irradiation. The cell number of the control group (not treated cells) was considered 100%. The experiment was carried out at least three times in triplicate. Each column represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ for comparison *versus* control and # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ for comparison from the respective group, as determined by ANOVA/Tukey–Kramer test

Figure 3. a) Relative gene expression profile of P2X7R on human glioma cell lines. b) Effect of irradiation (2 Gy) on P2X7R expression on M059J human glioma cell line. Overall results from N = 4 independent experiments. Each column represents the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ for comparison *versus* control, as determined by Student's *t* –test and ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ for comparison from the respective group, as determined by ANOVA/Tukey–Kramer test

Figure 4. Annexin V/PI positive M059J cells 24 h after treatment. Each sample has 50.000 cells. Data shown is representative of at least 2 independent experiments

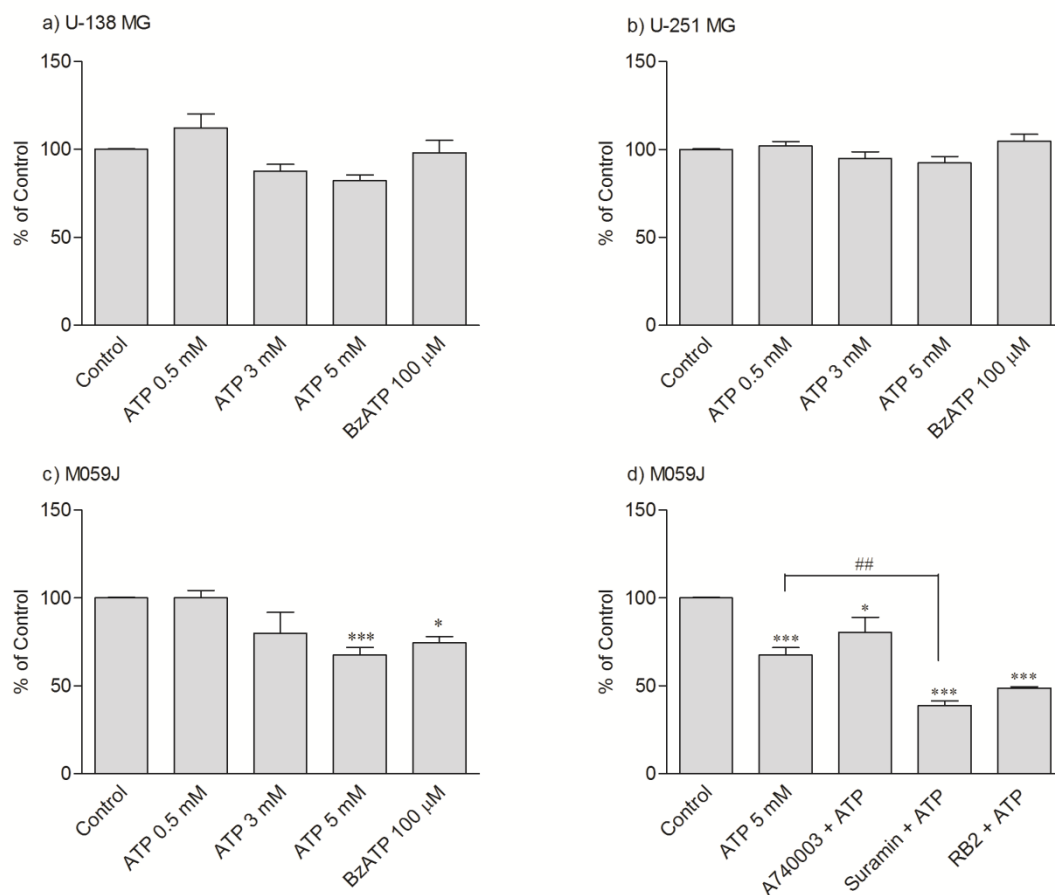
Figure 1

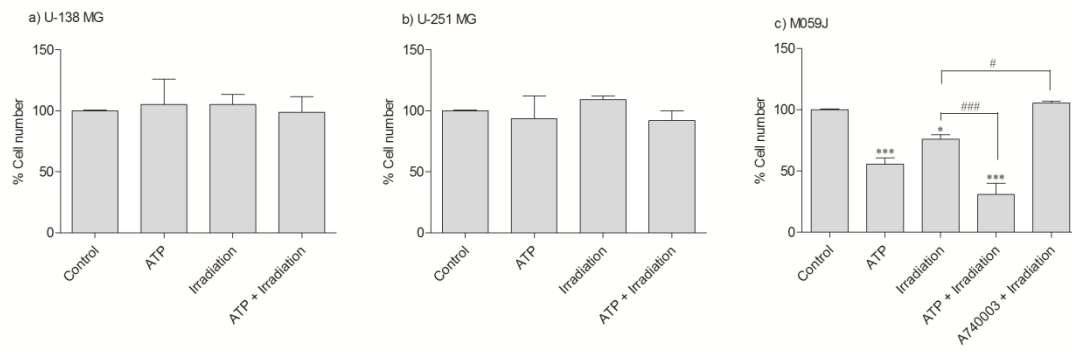
Figure 2

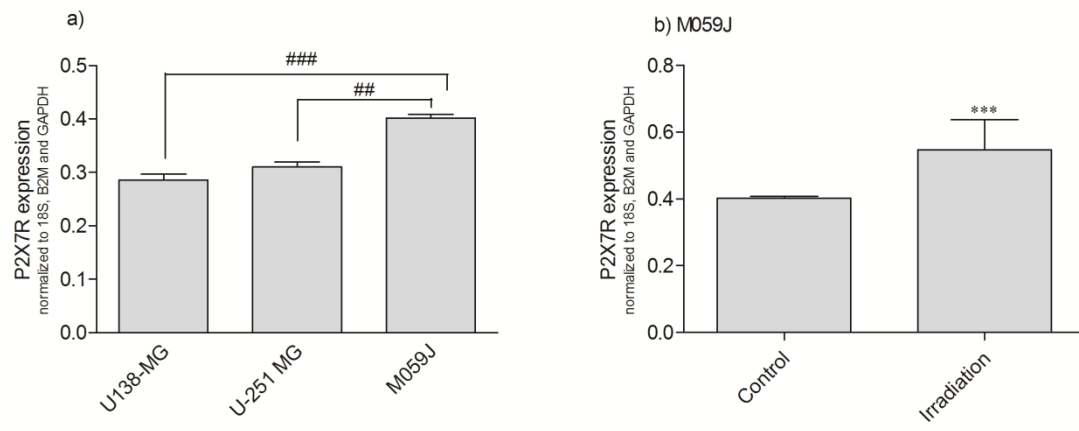
Figure 3

Figure 4

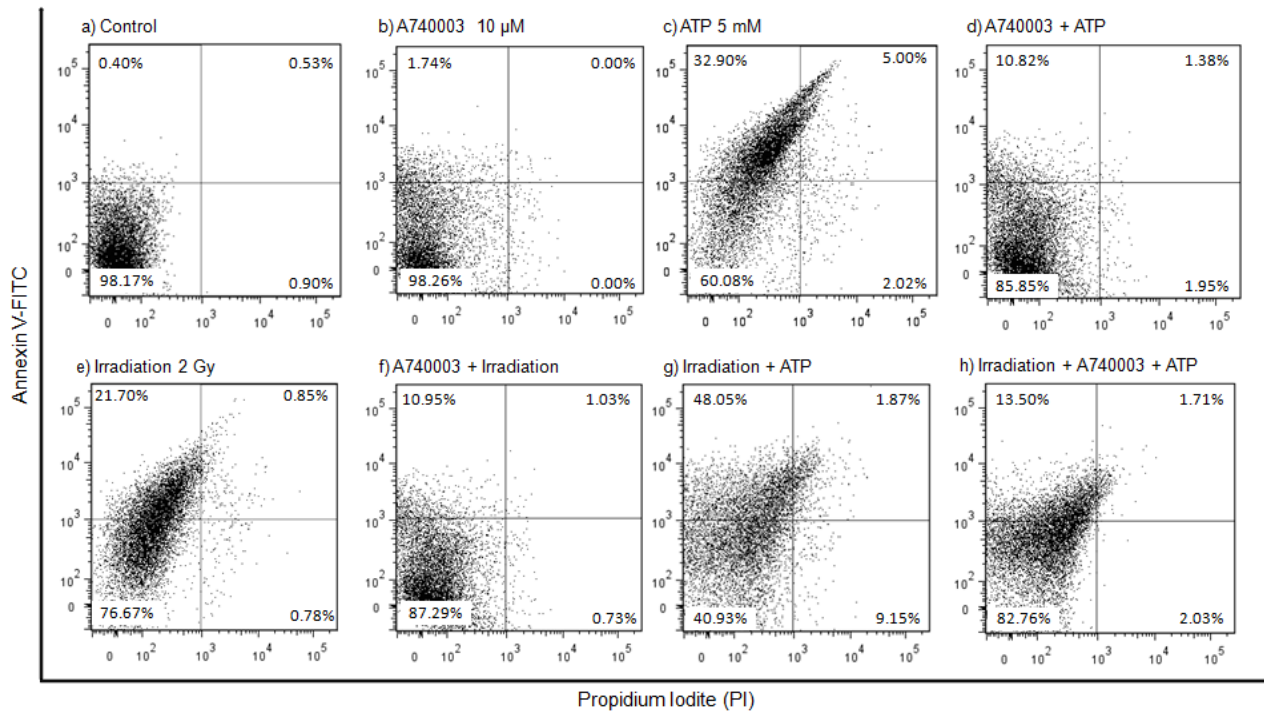


Table 1. Human primer sequences

Gene		Primers (5' –3')	Amplicon size (bp)	GenBank ID
β -actin*	F	CATCGAGCACGGCATCGTCA	211	NM_001101
	R	TAGCACAGCCTGGATAGCAAC		
18s*	F	GTAACCCGTTGAACCCCAT	151	NR_003286
	R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG		
B2M*	F	ACTGAATTCACCCCCACTG	114	NM_004048
	R	CCTCCATGATGCTGCTTACA		
GAPDH*	F	TGCACCACCAACTGCTTA	177	NM_002046
	R	GGATGCAGGGATGATGTTC		
P2X7R**	F	AAGCTGTACCAGCGGAAAGA	202	NM_002562
	R	GCTCTTGGCCTTCTGTTTTG		

Bp – base pairs; F – forward; R – reverse. *According to Rho et al., 2010. **According to Ben Yebdri et al., 2009.

3.2 CAPÍTULO II

*INTERACTION BETWEEN IL-17 AND P2X7R AS A NEW MECHANISM
IMPLICATED IN HUMAN GLIOMA CELL PROLIFERATION*

Artigo em preparação

INTERACTION BETWEEN IL-17 AND P2X7R AS A NEW MECHANISM IMPLICATED IN HUMAN GLIOMA CELL PROLIFERATION

¹Gehring M.P., ²Pereira T.C.B., ¹Zanin R.F., ³Borges M.C., ³Filho A.B., ²Bogo M.B., ⁴Campos M.M., ^{1,4}Morrone F.B.

¹Laboratório de Farmacologia Aplicada, PUCRS, Porto Alegre, RS – Brazil. ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), PUCRS, Porto Alegre, RS – Brazil. ³Serviço de Radioterapia, Hospital São Lucas, Porto Alegre, RS – Brazil. ⁴Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, RS – Brazil.

Abstract

Gliomas are the most common and deadly brain tumors and radiotherapy is the standard therapy. It is already known that radiation modulates cytokine secretion. IL-17 is a pro-inflammatory cytokine and its role in cancer still needs further investigation. It has been shown that activation of IL-17 receptor (IL-17/R) leads to the activation of NF- κ B in gliomas. Indeed, areas of necrosis in gliomas represent a constant source of extracellular nucleotides which are ligands of purinergic receptors. The activation of the purinergic receptor subtype P2X7 by ATP also activates NF- κ B, inducing local inflammation. This study aimed to elucidate the relevance of IL-17 to radiotherapy susceptibility as well as, to clarify the possible interaction between this cytokine and P2X7R in human glioma cells. The human glioma cell lines U-138 MG and M059J, corresponding to radiresistant and radiosensitive lineages, respectively, were used. The treatment with IL-17 (10 ng/ml) diminished in about 62% the human glioma cell line viability and induced cell death. Pharmacological blocking of P2X7R visibly reduced the toxicity caused by IL-17 (10 ng/ml), in both human glioma cell lines. Of note, IL-17 receptor expression was significantly augmented after irradiation. Our data present a possible participation of IL-17/R in radiation susceptibility. The results clearly indicate that IL-17 induces cytotoxic effect on human glioma cells and show a possible interaction of the P2X7R to the action of IL-17.

Keywords: cell death ; IL-17; irradiation; glioma, P2X7 receptor.

Introduction

Glioma is the most common and lethal type of primary brain tumor affecting adults (Karrlander et al., 2009). More than 20,000 cases are diagnosed every year in the USA and gliomas have a high mortality rate, reaching more than 70% of cases in two years after diagnosis (Filippi-Chiela et al., 2011).

Radiotherapy has been the mainstay of therapy for patients with malignant gliomas (Ohshima et al., 2010; Van Meir et al., 2010) and can lead to release of cytokines in various tissues. Cytokines are associated with development of late radiation damage that can occur in irradiated normal tissues and might also have systemic effects

after radiation treatment (Seruga et al., 2008). A study established IL-17A as a hemopoietic response cytokine to radiation injury in mice (Tan et al., 2006). However, whether conventional anti-cancer therapies such as radiotherapy modulate the cytokine receptor like IL-17R and its relevance for radiotherapy susceptibility on human glioma is yet unexplored.

Interleukin-17 (IL-17) is classified as a pro-inflammatory cytokine (Kehlen et al., 1999; Ma et al., 2011), and its role in cancer has recently become the focus of extensive investigation (Maniati et al., 2010). It was found that IL-17R mRNA is constitutively expressed in glioblastoma cells (Kehlen et al., 1999) and more recently, a study confirmed the presence of IL-17A in both human and mouse gliomas (Wainwright et al., 2010).

After binding to its receptor (IL-17/R), intracellular IL-17 signaling includes at least two downstream pathways. The first involves the transcription factor NF- κ B (Ivanov and Linden, 2009; Kehlen et al., 1999), which induces the coordinated expression of several genes encoding proteins involved in the synthesis of inflammatory mediators, and also the magnification and perpetuation of the inflammatory response (Kehlen et al., 1999). The second pathway involves Janus kinase (JAK)1 and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), followed by inactivation of glycogen synthase kinase (GSK)-3 β and gene activation (Ivanov and Linden, 2009). It is also well established that members of mitogen-activated protein (MAP) kinases family, c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38, are clearly involved in IL-17-induced responses (Ivanov and Linden, 2009; Kehlen et al., 1999). However, IL-17 role in gliomas still needs further investigation.

Areas of necrosis in glioblastoma represent a constant source of extracellular nucleotides that are purinergic receptor ligands (Morrone et al., 2003). As the brain has several purinergic receptors (Verkhatsky et al., 2009), glioma cells are able to release and respond to the nucleotide ATP (Jantarantotai et al., 2009). The activation of P2X7 purinergic receptor by ATP induces the activation of NF- κ B, phospholipase D (Kim et al., 2001) ERK, PKC, MAPK and PI3K/AKT (Jacques-Silva et al., 2004). Studies show that P2X7 receptor is responsible for ATP-induced death in various cell types (Tamajusuku et al., 2010). However, some human glioma cells are resistant to death induced by ATP-P2X7R binding (Morrone et al., 2005). One possible reason for this resistance may be a mutation in the C-terminal region of the receptor, causing lack of

apoptosis induction (Adinolfi et al., 2010; Bianco et al., 2009; Cheewatrakoolpong et al., 2005). Another possible explanation could be a low expression of the P2X7 receptor (Tamajusuku et al., 2010) or also mutations in downstream pathways induced by P2X7 receptor.

Once the modulation of purinergic receptors by inflammatory cytokines has been largely demonstrated (Khoa et al., 2001; Narcisse et al., 2005) and Di Virgilio et al. have shown the modulation of Th17 cells by ATP (Di Virgilio et al., 2009), we hypothesized a possible interaction between the purinergic receptor P2X7 and the pro-inflammatory cytokine IL-17. Furthermore, we also aimed to elucidate the effect of the IL-17 as well as, the IL-17 receptor relevance to radiotherapy susceptibility in human glioma cells.

Materials and Methods

Cell lines and cell culture

The U-138 MG and M059J (radiosensitive) human glioma cell lines were obtained from ATCC (Rockville, Maryland, USA). Cells were cultured in DMEM/15% FBS at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air.

Gamma irradiation

For the irradiation studies, U-138 and M059J cells were treated 24 h before. The cells were gamma irradiated at a 2 Gy-dose, using a Cobalt Theratron Phoenix equipment (Theratronics Ltd, Ontario, Canada), at a source-to-target distance of 70 cm (Hoppe et al., 2000).

Cell viability

Glioma cells were seeded at 7×10^3 cells per well in 96-well plates and grown for 24 h. Cells were treated with IL-17 (5, 10 and 20 ng/ml) for 24 h. Subsequently, 100 µl of MTT solution (90% DMEM/10% MTT 5 mg/ml in PBS) were added to the cells and incubated for 3 h. The formazan crystals, formed by tetrazolium cleavage, were dissolved with 100 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO) for 10 min and quantified in Spectra Max M2e (Molecular Devices) at 595 nm. This absorbance was linearly

proportional to the number of live cells with active mitochondria. The cell viability was calculated using Eq. (1):

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{Abs}_s / \text{Abs}_{\text{control}})100$$

where Abs_s is the absorbance of cells treated with different formulations and $\text{Abs}_{\text{control}}$ is the absorbance of control cells (incubated with cell culture medium only).

Annexin V/PI flow cytometry staining technique

Glioma cells were seeded at 4×10^4 cells per well in 24-well plates and grown for 24 h. The cells were treated with IL-17 (10 ng/ml) for 24 h. Dead cells were quantified by annexin V-FITC–propidium iodide (PI) double staining, using FITC Annexin V / Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen) 24 h after treatment, according to the manufacturer's instructions. Experiments were performed on BD FACSCanto II flow cytometer and the results were analyzed using FlowJo Software (Tree Star).

Analysis of IL-17R mRNA expression

Glioma cells were seeded at 2×10^5 cells per well in 6-well plates and grown for 24 h. The cells were irradiated (2 Gy) and the control cells had just the medium changed; after 24 h, the cells were collected. Total RNA was isolated with Trizol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA were synthesized with ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) from 1 μg total RNA in accordance with the manufacturer's instructions. All quantitative PCR were performed using SYBR Green I (Invitrogen) to detect double-strand cDNA synthesis. Relative expression levels were determined with 7500 Fast Real-Time System Sequence Detection Software v.2.0.5 (Applied Biosystems). The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR 11.0 Software (<http://LinRegPCR.nl>). Relative RNA expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. The stability of the reference genes 18S, β -actin, B2M, GAPDH (*M-value*) and the optimal number of reference genes according to the pair-wise variation (*V*) were analyzed by GeNorm 3.5 Software (<http://medgen.ugent.be/genorm/>).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (one-way ANOVA), followed by Tukey–Kramer post-hoc test, using GraphPad Software (San Diego, CA, U.S.A.). *p* values <0.05 were taken to indicate statistical significance.

Results

Cell viability

In this study, we initially tested the effects of IL-17 on the viability of U-138 and M059J glioma cell lines. As shown in Fig. 1A-B, all the tested concentrations of IL-17 (5, 10 or 20 ng/ml) significantly diminished U-138 cell viability ($53.7\% \pm 5.7$, $66.3\% \pm 1.2$ and $55.5\% \pm 0.7\%$, respectively). Regarding the M059J lineage, the cell viability was reduced only when treated with IL-17 at 10 or 20 ng/ml ($58.2\% \pm 0.5$ and $57.6\% \pm 8.6$, respectively). These results show, for the first time, that treatment with IL-17 induced cell cytotoxicity on human glioma cell lines.

To investigate a possible modulation of P2X7R by IL-17, the human glioma cell lines were incubated with the selective P2X7R antagonist A740003 (10 μ M) 20 min before adding IL-17 (10 ng/ml). A740003 antagonist was able to reverse the toxicity caused by IL-17 (10 ng/ml) on U-138 MG human glioma cell line (from $66.3 \pm 1.2\%$ to $30.4\% \pm 9.3$) (Fig. 2A). Regarding the M059J cell line, our results show a partial, but not significant reduction in the toxicity caused by IL-17, by blocking the P2X7 receptor (Fig. 2B).

As we shown in the other study, only the M059J is ATP-sensitive due to this fact we just tested the ATP-IL-17 response on this lineage. Our data with the radiosensitive M059J human glioma cell line revealed that IL-17 (10 ng/ml) significantly decreases the viability of this cell line ($58.2 \pm 0.4\%$) when compared to treatment with ATP (5 mM) alone ($32.4\% \pm 4.1$) (Fig. 2C). The co-treatment with ATP (5 mM) and IL-17 (10 ng/ml) significantly reduced the cell viability ($73.5\% \pm 1.3$) of the M059J cell line when compared with ATP (5 mM) treatment (Fig. 2C), showing that ATP and IL-17 seem to have a synergistic effect.

Annexin V/PI flow cytometry staining technique

We also investigated whether IL-17 induce cell death in both U-138 and M059J human glioma cell lines. Our preliminary result show that treatment with IL-17 (10 ng/ml) induced a clear increase in annexin V-positive and propidium iodide population

on U-138 lineages (73.5% and 23.4%, respectively) (Fig.3B), and an increase predominantly in propidium iodide population on M059J cell line (67.2%). These results indicate that IL-17, at this concentration, induces apoptosis/necrosis cell death on human glioma cell lines. More experiments are needed to confirm these results.

Analysis of IL-17R mRNA expression

Further, we evaluated the expression of IL-17R in U-138 and M059J human glioma cells exposed to radiation (2 Gy). Representative results are presented in Figure 4. Notably, the irradiation caused a marked increase in IL-17R expression in both lineages, when compared to their respective controls (from 0.40 ± 0.03 to 0.55 ± 0.02 and from 0.54 ± 0.03 to 0.71 ± 0.05 , respectively), indicating that this increase in IL-17R could be related to radiation susceptibility.

Interestingly, the radiosensitive M059J lineage expressed significantly higher IL-17R levels when compared to the radioresistant cell line U-138 (0.54 ± 0.03 , and 0.40 ± 0.03 , respectively). Moreover, similar results were obtained when we compared the IL-17R expression between the lineages 24 h after irradiation (2 Gy) (0.71 ± 0.05 and 0.55 ± 0.02 , respectively). This difference could account, at least in part, to the radiosensitive feature of M059J lineage. We might infer that IL-17/R probably triggers an inflammatory response leading to cell death.

Since radiation can induce the production of cytokines, we further investigated whether these cell lines could secrete IL-17. Our results show that both human glioma cell lines studied herein did not secrete detectable levels of the cytokine IL-17, even when treated with irradiation 2 Gy or ATP (5 mM) (data not shown).

Discussion

Radiation therapy can induce the release of cytokines in various tissues (Seruga et al., 2008). A previous study demonstrated that IL-17A is secreted by T-cells, as a hematopoietic response to radiation injury in mice (Tan et al., 2006). The present study provides the first report about a possible relevance of the purinergic receptor P2X7 for the cytotoxicity induced by IL-17 (10 ng/ml). It is important to notice that IL-17 shares transcriptional pathways with some other factors such as IL-1 and TNF. It can activate NF- κ B and all three classes of MAPKs, including ERK1/2, JNK, and p38 (Lubberts et al., 2005). The possible role of P2X7 receptor to the actions of IL-17 could occur

because common pathways that are activated by this cytokine and this purinergic receptor, including NF- κ B, MAPK, ERK and PI3K (Ivanov and Linden, 2009). Furthermore, the treatment with ATP (5 mM) and IL-17 activates the P2X7 and the IL-17 receptor, which probably share similar pathways leading to a greater cytotoxicity. Therefore, it is important to investigate whether IL-17 induces glioma cells to secrete ATP and if there is a naturally occurring ATP in the culture medium of cells plated.

Data regarding the role of IL-17 in tumor development are not consensual. Zou and Restifo (2010) highlighted that exogenously delivered IL-17 might display different effects in comparison to endogenous IL-17. Therefore, the biological activities of exogenous *versus* endogenous IL-17 might not be identical (Zou and Restifo, 2010). Herein, we present some novel results showing anti-proliferative effects for exogenous IL-17 in human glioma cell lines. A recent research showed that an anticancer effect of infused T cells was lost when they lacked IL-17A (Ma et al., 2011). Reinforcing this idea, other studies have shown that increasing the levels of IL-17 in the tumor microenvironment, by means of a T-cell-dependent mechanism, leads to tumor cell growth inhibition, improving survival in murine models of hematopoietic and pancreatic cancer (Benchetrit et al., 2002; Gnerlich et al., 2010). Better comprehension of the processes regulating IL-17 pro- or anti-tumor activities might well allow the development of more effective strategies for cancer treatment (Maniati et al., 2010).

Our data also show the modulation of IL-17R expression by radiotherapy. Accordingly, radiation induces IL-17 release from T-cells as described by Tan et al., 2006; and we showed that radiation increased IL-17R expression in human glioma cells. We believe that this mechanism accounts to the anti-tumoral immune response in the tumor microenvironment. It is already known that IL-17 stimulates the expression of I κ B α mRNA, as well as the secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 in glioblastoma cell lines (Kehlen et al., 1999). Thus, irradiation appears to stimulate the immune system – an interesting mechanism to reverse the several mechanisms generated by glioblastoma to escape from the immunesurveillance (Szabo and Carpentier, 2011; Van Meir et al., 2010), as this tumor type is able to synthesize and secrete multiple factors that finally inhibit T-cell responsiveness (Okada et al., 2009).

The activation of the IL-17/R pathway *in vitro* might induce glioma cells to secrete cytokines in the culture medium (Ivanov and Linden, 2009; Kehlen et al., 1999), that in turn induces cell death itself or perhaps via IL-17/R. Nevertheless, we showed

herein that human glioma cell lines are not able to secrete IL-17, even when stimulated with irradiation, probably because so far only immune cells were described as the main IL-17 secretors (Ivanov and Linden, 2009; Moseley et al., 2003).

Our data present a possible participation of IL-17/R pathway in irradiation susceptibility. Furthermore, our results clearly indicate a cytotoxic effect of IL-17 and show a possible interaction of the P2X7R to the action of IL-17 in human glioma cells. However, this research is in early stage, and we are planning to conduct additional investigations in a glioma mouse model. The present work also points towards future experiments to discover the concentrations of IL-17 that are secreted in the tumor microenvironment, what might allow development of a possible IL-17-based immunotherapy.

References

- Adinolfi, E., Cirillo, M., Woltersdorf, R., Falzoni, S., Chiozzi, P., Pellegatti, P., Callegari, M.G., Sandona, D., Markwardt, F., Schmalzing, G., Di Virgilio, F., 2010. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J* 24, 3393-3404.
- Benchetrit, F., Ciree, A., Vives, V., Warnier, G., Gey, A., Sautes-Fridman, C., Fossiez, F., Haicheur, N., Fridman, W.H., Tartour, E., 2002. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 99, 2114-2121.
- Bianco, F., Colombo, A., Saglietti, L., Lecca, D., Abbracchio, M.P., Matteoli, M., Verderio, C., 2009. Different properties of P2X(7) receptor in hippocampal and cortical astrocytes. *Purinergic Signal* 5, 233-240.
- Cheewatrakoolpong, B., Gilchrest, H., Anthes, J.C., Greenfeder, S., 2005. Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 17-27.
- Di Virgilio, F., Boeynaems, J.M., Robson, S.C., 2009. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol* 9, 507-513.
- Filippi-Chiela, E.C., Villodre, E.S., Zamin, L.L., Lenz, G., 2011. Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS One* 6, e20849.
- Gnerlich, J.L., Mitchem, J.B., Weir, J.S., Sankpal, N.V., Kashiwagi, H., Belt, B.A., Porembka, M.R., Herndon, J.M., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P., Linehan, D.C., 2010. Induction of Th17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* 185, 4063-4071.
- Hoppe, B.S., Jensen, R.B., Kirchgessner, C.U., 2000. Complementation of the radiosensitive M059J cell line. *Radiat Res* 153, 125-130.
- Ivanov, S., Linden, A., 2009. Interleukin-17 as a drug target in human disease. *Trends Pharmacol Sci* 30, 95-103.
- Iwami, K., Natsume, A., Wakabayashi, T., 2011. Cytokine networks in glioma. *Neurosurg Rev* 34, 253-263; discussion 263-254.
- Jacques-Silva, M.C., Bernardi, A., Rodnight, R., Lenz, G., 2004. ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line. *Oncology* 67, 450-459.
- Jantaratnotai, N., Choi, H.B., McLarnon, J.G., 2009. ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells. *BMC Cancer* 9, 442.
- Karrlander, M., Lindberg, N., Olofsson, T., Kastemar, M., Olsson, A.K., Uhrbom, L., 2009. Histidine-rich glycoprotein can prevent development of mouse experimental glioblastoma. *PLoS One* 4, e8536.
- Kehlen, A., Thiele, K., Riemann, D., Rainov, N., Langner, J., 1999. Interleukin-17 stimulates the expression of IkappaB alpha mRNA and the secretion of IL-6 and IL-8 in glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* 101, 1-6.
- Khoa, N.D., Montesinos, M.C., Reiss, A.B., Delano, D., Awadallah, N., Cronstein, B.N., 2001. Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A(2A) receptors in human monocytic THP-1 cells. *J Immunol* 167, 4026-4032.
- Kim, M., Jiang, L.H., Wilson, H.L., North, R.A., Surprenant, A., 2001. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* 20, 6347-6358.
- Lubberts, E., Schwarzenberger, P., Huang, W., Schurr, J.R., Peschon, J.J., van den Berg, W.B., Kolls, J.K., 2005. Requirement of IL-17 receptor signaling in radiation-resistant cells in the joint for full progression of destructive synovitis. *J Immunol* 175, 3360-3368.
- Ma, Y., Aymeric, L., Locher, C., Mattarollo, S.R., Delahaye, N.F., Pereira, P., Boucontet, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Casares, N., Lasarte, J.J., Matsuzaki, G., Ikuta, K., Ryffel, B., Benlagha, K., Tesniere, A., Ibrahim, N., Dechanet-Merville, J., Chaput, N., Smyth, M.J., Kroemer, G., Zitvogel,

- L., 2011. Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med* 208, 491-503.
- Maniati, E., Soper, R., Hagemann, T., 2010. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene* 29, 5653-5662.
- Morrone, F.B., Horn, A.P., Stella, J., Spiller, F., Sarkis, J.J., Salbego, C.G., Lenz, G., Battastini, A.M., 2005. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurooncol* 71, 135-140.
- Morrone, F.B., Jacques-Silva, M.C., Horn, A.P., Bernardi, A., Schwartzmann, G., Rodnigh, R., Lenz, G., 2003. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurooncol* 64, 211-218.
- Moseley, T.A., Haudenschild, D.R., Rose, L., Reddi, A.H., 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 155-174.
- Narcisse, L., Scemes, E., Zhao, Y., Lee, S.C., Brosnan, C.F., 2005. The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 49, 245-258.
- Ohshima, Y., Tsukimoto, M., Takenouchi, T., Harada, H., Suzuki, A., Sato, M., Kitani, H., Kojima, S., 2010. gamma-Irradiation induces P2X(7) receptor-dependent ATP release from B16 melanoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1800, 40-46.
- Okada, H., Kohanbash, G., Zhu, X., Kastnerhuber, E.R., Hoji, A., Ueda, R., Fujita, M., 2009. Immunotherapeutic approaches for glioma. *Crit Rev Immunol* 29, 1-42.
- Rho, H.W., Lee, B.C., Choi, E.S., Choi, I.J., Lee, Y.S., Goh, S.H., 2010. Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. *BMC Cancer* 10, 240.
- Seruga, B., Zhang, H., Bernstein, L.J., Tannock, I.F., 2008. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 887-899.
- Szabo, A.T., Carpentier, A.F., 2011. Immunotherapy in human glioblastoma. *Rev Neurol (Paris)*.
- Tamajusuku, A.S., Villodre, E.S., Paulus, R., Coutinho-Silva, R., Battastini, A.M., Wink, M.R., Lenz, G., 2010. Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *J Cell Biochem* 109, 983-991.
- Tan, W., Huang, W., Zhong, Q., Schwarzenberger, P., 2006. IL-17 receptor knockout mice have enhanced myelotoxicity and impaired hemopoietic recovery following gamma irradiation. *J Immunol* 176, 6186-6193.
- Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.K., Wen, P.Y., Olson, J.J., 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60, 166-193.
- Verkhatsky, A., Krishtal, O.A., Burnstock, G., 2009. Purinoceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol* 39, 190-208.
- Wainwright, D.A., Sengupta, S., Han, Y., Ulasov, I.V., Lesniak, M.S., 2010. The presence of IL-17A and T helper 17 cells in experimental mouse brain tumors and human glioma. *PLoS One* 5, e15390.
- Zou, W., Restifo, N.P., 2010. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10, 248-256.

Figures and Legends

Figure 1. Effect of IL-17 treatment (5, 10 and 20 ng/ml) after 24 h on cell viability of human glioma cell lines A) U-138 and B) M059J. The experiments were carried out at least three times in triplicate. Each column represents the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ for comparison of IL-17 *versus* control as determined by ANOVA/Tukey–Kramer test

Figura 2. Effect of treatment with selective P2X7R antagonist A740003 (10 μ M) and 20 min after treated with IL-17 (10 ng/ml) on the cell viability of human glioma cell lines A) U-138 and B) M059J, after 24 h. C) Effect of the treatment with ATP (5 mM) and co-treatment with IL-17 (10 ng/ml) and ATP (5 mM) on the cell viability of the human glioma lineage M059J after 24 h. The experiments were carried out at least three times in triplicate. Each column represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ for comparison *versus* control and ## $p < 0.01$; ### $p < 0.01$ for comparison from the respective group, as determined by ANOVA/Tukey–Kramer test

Figure 3. Annexin V/PI positive human glioma cells 24 h after treatment with IL-17 (10 ng/ml). Each sample has 20.000 cells. Data shown is representative of 1 experiment

Figure 4. Relative gene expression profile of IL-17R (Control) and effect of irradiation (2 Gy) on IL-17R expression, after 24 h, on human glioma cell lines U-138 and M059J. Overall results from N = 4 independent experiments. Each column represents the mean \pm SEM * $p < 0.01$ for comparison of irradiated *versus* control on the same lineage and # $p < 0.01$ for comparison of the same treatments between the lineages as determined by ANOVA/Tukey–Kramer test

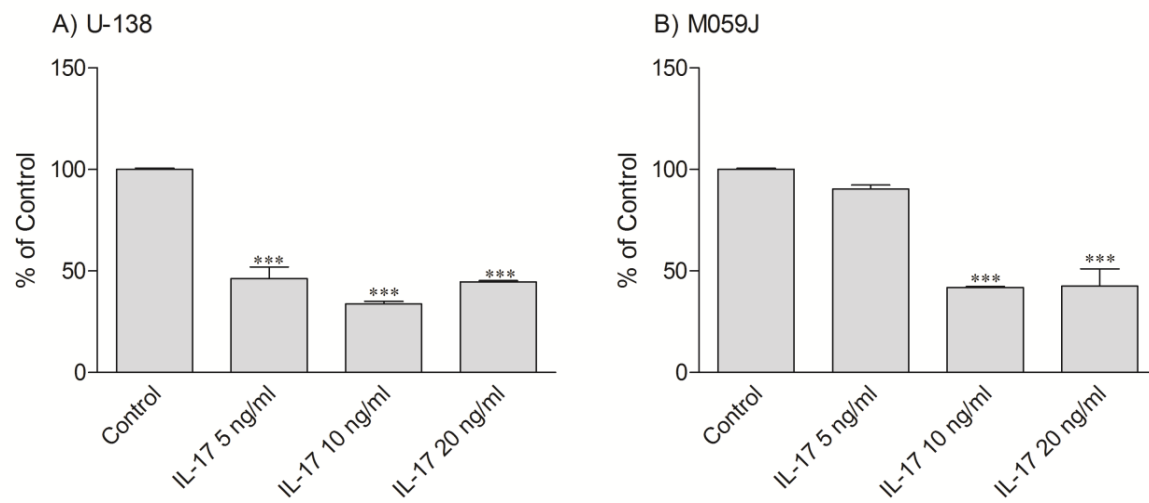
Figure 1

Figure 2

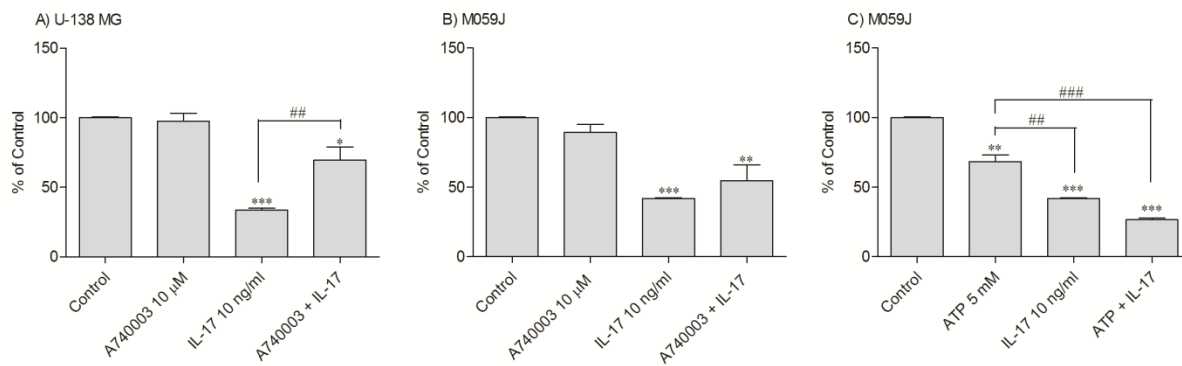


Figure 3

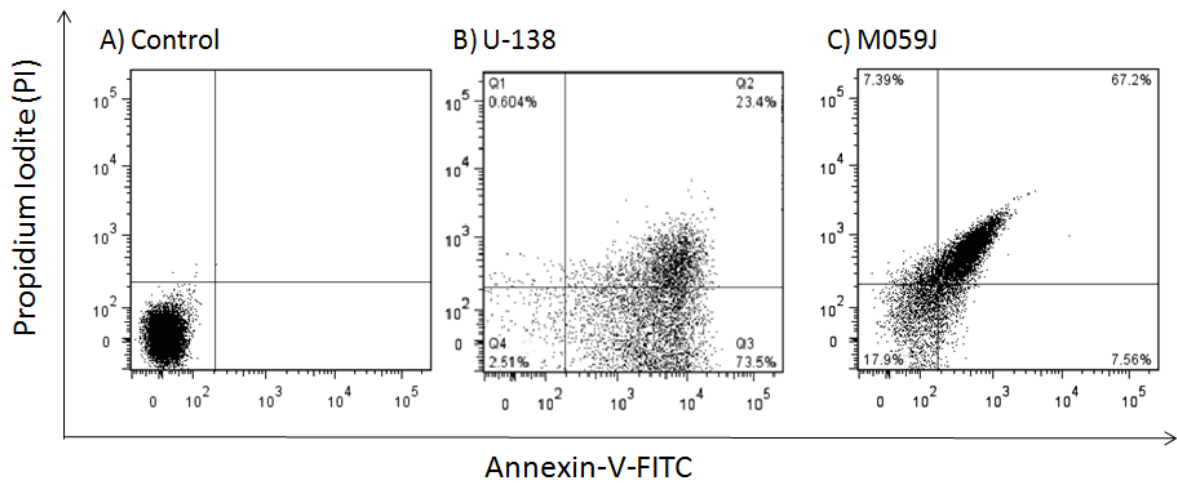


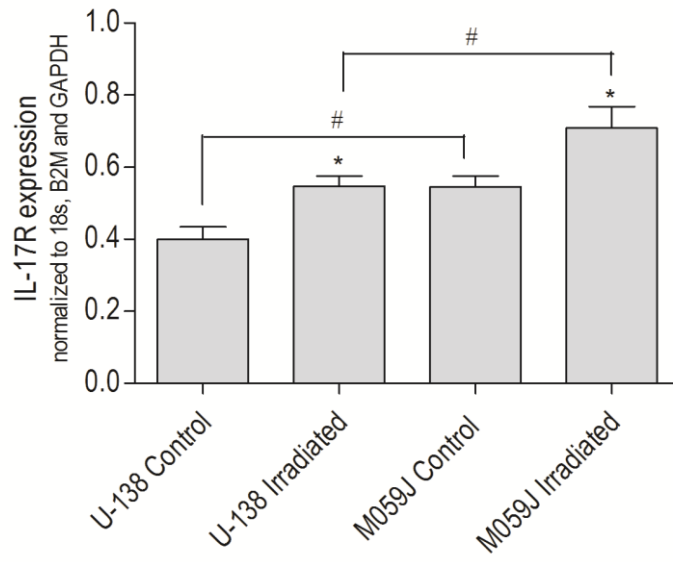
Figure 4

Table 1. Human primer sequences

Gene	Primers (5' –3')	Amplicon size (bp)	GenBank ID
β -actin*	F CATCGAGCACGGCATCGTCA R TAGCACAGCCTGGATAGCAAC	211	NM_001101
18s*	F GTAACCCGTTGAACCCCAT R CCATCCAATCGGTAGTAGCG	151	NR_003286
B2M*	F ACTGAATTCACCCCCACTG R CCTCCATGATGCTGCTTACA	114	NM_004048
GAPDH*	F TGCACCACCAACTGCTTA R GGATGCAGGGATGATGTTC	177	NM_002046
IL-17R	F CGTGAGGGAGCACCTCGAAGGCTT R GGGAGCTCCTGGAGATGTAGCCCT GGTC	175	NM_014339

Bp – base pairs, F – Forward, R – Reverse. * According to (Rho et al., 2010).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo, primeiramente buscou caracterizar a linhagem de glioma humano radiosensível M059J (Hoppe, Jensen et al. 2000; Virsik-Kopp, Rave-Frank et al. 2003; Daido, Yamamoto et al. 2005) em relação à resposta ao ATP via receptor P2X7. De maneira interessante, observou-se que as linhagens resistentes à irradiação (U-138 MG e U-251 MG) mostraram-se também resistentes à ação do ATP via receptor P2X7, enquanto que a linhagem radiosensível (M059J) apresentou sensibilidade a esta via, tendo o ATP induzido morte por apoptose neste tipo celular. Estes resultados direcionaram o estudo para a investigação de uma possível relação entre o receptor purinérgico P2X7 e a resistência das células de glioma à irradiação.

Embora a radioterapia venha sendo amplamente usada para o tratamento de pacientes com GBM, a radioresistência intrínseca destes tumores permanece um problema crítico na gestão de tais pacientes. A caracterização de diferenças nos perfis de expressão gênica exibido por células de glioma irradiadas *in vitro* pode fornecer informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na radioresistência (Bassi, Mello et al. 2008). Neste trabalho foi investigada a diferença na expressão do receptor P2X7 entre as linhagens de glioma humano radiosensíveis e radioresistentes. Observou-se uma expressão, tanto basal quanto após a irradiação, significativamente maior do receptor na linhagem radiosensível quando comparada com as linhagens radioresistentes, levantando a hipótese de esta ser mais uma das vias relacionadas com radioresistência de células de glioma.

Tamajusuku e colaboradores (2010) mostraram uma correlação positiva entre a a morte celular induzida pelo ATP e uma maior expressão do receptor (Tamajusuku, Villodre et al. 2010). Corroborando com este resultado, no presente estudo as linhagens de glioma humano resistentes ao ATP apresentaram uma menor expressão basal do receptor P2X7. Outra resposta para essa resistência à morte induzida pela ativação da via ATP-P2X7R apresentada por estas linhagens celulares poderia ser a presença de polimorfismo(s), característica comum a este receptor (Stagg and Smyth 2010), que leva a falha tanto na formação do poro quanto na indução da morte celular induzida pelo receptor P2X7 (Cheewatrakoolpong, Gilchrest et al. 2005; Adinolfi, Cirillo et al. 2010).

Quando o receptor P2X7 foi bloqueado na linhagem de glioma humano radiosensível M059J, reduziu-se em 50,4% a morte por apoptose induzida pela

irradiação. Ohshima e colaboradores (2010) mostraram que a irradiação induz a liberação de ATP (Ohshima, Tsukimoto et al. 2010). Deste modo, nesta dissertação propomos um mecanismo de radiosensibilização adicional, em que a ativação do receptor P2X7 funcional poderia estar implicado. O ATP liberado pela irradiação ativaria o receptor P2X7 que causaria, juntamente com outros mecanismos induzidos pela irradiação, a morte celular por apoptose em células sensíveis à irradiação e ATP.

Estudos anteriores demonstraram que a radiosensibilidade da linhagem celular M059J deve-se à falta da proteína DNA-PK nesta célula, enzima que repara o dano causado pela irradiação (Hoppe, Jensen et al. 2000; Virsik-Kopp, Rave-Frank et al. 2003; Daido, Yamamoto et al. 2005). Este estudo propõe, pela primeira vez, é que o receptor P2X7 é mais uma das vias ativadas na morte induzida pela irradiação, e quando este receptor está pouco expresso ou polimórfico pode levar à radioresistência da célula de glioma. Atualmente, fármacos baseados em citocinas e anticitocinas estão tendo um papel crucial no tratamento de gliomas malignos (Iwami, Natsume et al. 2011). Com base neste conceito, buscamos investigar qual é o efeito da citocina pró-inflamatória descoberta recentemente, IL-17, pois ainda não há estudos mostrando a ação direta da IL-17 exógena no GBM.

Sabe-se que a irradiação induz à liberação de citocinas (Seruga, Zhang et al. 2008), mas ainda não foi muito explorado se este tipo de terapia também pode modular receptores de citocinas. A interação entre citocinas e seus receptores resulta na formação de uma rede de interação no local do tumor, que é primariamente responsável pela progressão de tumores em geral, mas também é responsável pela disseminação de respostas imunes antitumorais e pela indução da rejeição tumoral (Iwami, Natsume et al. 2011).

Neste estudo, observamos que a irradiação induz a um aumento na expressão do receptor da IL-17 nas células de glioma humano. A IL-17 já foi descrita como uma citocina de resposta das células hematopoiéticas a lesão induzidas por irradiação em camundongos (Tan, Huang et al. 2006). Considerando esses dados, hipotetizamos um possível mecanismo pelo qual as células de glioma, danificadas pela irradiação, tentariam ativar o sistema imune, através da via IL-17/R, levando assim a um aumento ou indução da inflamação no local pela atividade pró-inflamatória da IL-17, já que as células tumorais inibem essa atividade anti-tumoral das células imunes (Iwami, Natsume et al. 2011).

Sabe-se que as células de glioma expressam constitutivamente o receptor para esta citocina (IL-17R) (Kehlen, Thiele et al. 1999; Wainwright, Sengupta et al. 2010) e que a ligação IL-17/R nestas células estimula a expressão de I κ B α e a secreção de IL-6 e IL-8 (Kehlen, Thiele et al. 1999). Entretanto, os resultados em relação a atividade pró ou anti-tumoral da IL-17 não são unânimes. Isto pode ser devido à concentração da IL-17 utilizada em cada um dos estudos. A concentração de IL-17 exógena pode ser diferente da concentração da IL-17 endógena, provavelmente, acarretando estímulos diferentes (Zou and Restifo 2010).

Este estudo mostrou que a IL-17 exógena reduziu em aproximadamente 62% a viabilidade celular e induziu a morte nas duas linhagens de glioma humano testadas (U-138 MG e M059J), representando um potencial utilização desta citocina como fármaco para o tratamento de gliomas malignos. Porém, as vias pelas quais a IL-17 induz citotoxicidade nestas células ainda precisam ser investigadas.

Outros resultados, ainda preliminares, mostraram uma possível interação entre a citocina pró-inflamatória IL-17 e o receptor purinérgico P2X7, pois o bloqueio do receptor P2X7 reduziu a citotoxicidade induzida pela IL-17 (10 ng/ml). Isso pode ser explicado tendo em vista que estes dois mecanismos ativam vias intracelulares semelhantes como a NF- κ B, MAPK, ERK and PI3K (Ivanov and Linden 2009). A presença de ATP e IL-17 no meio de cultura tornam estas duas vias (P2X7R/IL-17R) ativadas, aumentando a citotoxicidade nas células de glioma, como mostrado no segundo capítulo deste estudo. Entretanto, outras análises *in vivo* serão realizadas para melhor entender essa interação e dar continuidade nesta investigação.

Este trabalho buscou aprimorar o conhecimento sobre a biologia do GBM, pois, mesmo se tendo conhecimento sobre a malignidade deste tipo tumoral, ainda sabe-se pouco sobre os mecanismos envolvidos na resistência apresentada aos tratamentos usualmente prescritos. O foco deste estudo foi o mecanismo pelo qual as células de glioma humano desenvolvem resistência à irradiação e à morte induzida pelo ATP.

Esta dissertação mostra, pela primeira vez, a participação do receptor P2X7 no mecanismo de morte induzida por irradiação em células de glioma humano. Além disso, demonstrou-se que a IL-17 induz citotoxicidade nestas células e o antagonista do receptor P2X7 foi capaz de reverter isto, indicando uma possível interação entre esta citocina pró-inflamatória e este receptor purinérgico. O entendimento destes mecanismos trará uma melhor compreensão da biologia deste glioma, trazendo assim

novas idéias para o desenvolvimento de terapias mais eficientes para a cura desta doença.

5 PERSPECTIVAS

Este estudo deixa algumas perspectivas, visando a análise da funcionalidade do receptor purinérgico P2X7 e da citocina pró-inflamatória interleucina-17 em células de glioma humano e a possível correlação entre estas duas vias:

- Silenciar o receptor P2X7, através da técnica de RNAi, na linhagem radiosensível de glioma humano M059J e avaliar a resposta a irradiação.
- Avaliar a secreção de citocinas nas células de glioma humano após o tratamento com irradiação, ATP ou IL-17.
- Investigar as vias de sinalização celular envolvidas na ativação do IL-17/R em células de glioma humano.
- Realizar o seqüenciamento do receptor P2X7 nas células de glioma humano resistentes ao ATP.
- Investigar se o estímulo com IL-17 ou ATP alteram a expressão dos receptores IL-17R e P2X7R.
- Realizar estudos *in vivo* com modelo de glioma em camundongos para melhor entender o efeito da IL-17 nos gliomas e a interação desta citocina com o receptor P2X7.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbracchio, M. P., G. Burnstock, et al. (2009). "Purinergic signalling in the nervous system: an overview." Trends Neurosci **32**(1): 19-29.
- Adinolfi, E., M. Cirillo, et al. (2010). "Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor." FASEB J **24**(9): 3393-3404.
- Bassi, C., S. S. Mello, et al. (2008). "Transcriptional changes in U343 MG-a glioblastoma cell line exposed to ionizing radiation." Hum Exp Toxicol **27**(12): 919-929.
- Bedford, J. S. and W. C. Dewey (2002). "Radiation Research Society. 1952-2002. Historical and current highlights in radiation biology: has anything important been learned by irradiating cells?" Radiat Res **158**(3): 251-291.
- Benchetrit, F., A. Ciree, et al. (2002). "Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism." Blood **99**(6): 2114-2121.
- Bianco, F., A. Colombo, et al. (2009). "Different properties of P2X(7) receptor in hippocampal and cortical astrocytes." Purinergic Signal **5**(2): 233-240.
- Bidros, D. S., J. K. Liu, et al. (2010). "Future of convection-enhanced delivery in the treatment of brain tumors." Future Oncol **6**(1): 117-125.
- Boeynaems, J. M. and D. Communi (2006). "Modulation of inflammation by extracellular nucleotides." J Invest Dermatol **126**(5): 943-944.
- Burnstock, G. (2004). "Geoffrey Burnstock: most highly cited scientist." Mol Interv **4**(4): 192-195.
- Burnstock, G. (2004). "Introduction: P2 receptors." Curr Top Med Chem **4**(8): 793-803.
- Burnstock, G. (2006). "Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling." Pharmacol Rev **58**(1): 58-86.
- Carlson, B. L., P. T. Grogan, et al. (2009). "Radiosensitizing effects of temozolomide observed in vivo only in a subset of O6-methylguanine-DNA methyltransferase methylated glioblastoma multiforme xenografts." Int J Radiat Oncol Biol Phys **75**(1): 212-219.
- Cheewatrakoolpong, B., H. Gilchrest, et al. (2005). "Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel." Biochem Biophys Res Commun **332**(1): 17-27.

- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.
- Dai, C. and E. C. Holland (2001). "Glioma models." Biochim Biophys Acta **1551**(1): M19-27.
- Daido, S., A. Yamamoto, et al. (2005). "Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy." Cancer Res **65**(10): 4368-4375.
- Delattre, J. Y. (2011). "[Glioblastoma in the elderly]." Rev Neurol (Paris) **167**(10): 680-682.
- Di Virgilio, F., S. Ceruti, et al. (2009). "Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system." Trends Neurosci **32**(2): 79-87.
- Dutreix, M., J. M. Cosset, et al. (2010). "Molecular therapy in support to radiotherapy." Mutat Res **704**(1-3): 182-189.
- Figarella-Branger, D., C. Colin, et al. (2008). "[Histological and molecular classification of gliomas]." Rev Neurol (Paris) **164**(6-7): 505-515.
- Frenel, J. S., M. Botti, et al. (2009). "[Prognostic and predictive factors for gliomas in adults]." Bull Cancer **96**(4): 357-367.
- Gaffen, S. L. (2009). "Structure and signalling in the IL-17 receptor family." Nat Rev Immunol **9**(8): 556-567.
- Gnerlich, J. L., J. B. Mitchem, et al. (2010). "Induction of Th17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer." J Immunol **185**(7): 4063-4071.
- Ho, I. A., K. M. Hui, et al. (2010). "Isolation of peptide ligands that interact specifically with human glioma cells." Peptides **31**(4): 644-650.
- Holgersson, A., T. Heiden, et al. (2005). "Different G2/M accumulation in M059J and M059K cells after exposure to DNA double-strand break-inducing agents." Int J Radiat Oncol Biol Phys **61**(3): 915-921.
- Holland, E. C. (2000). "Glioblastoma multiforme: the terminator." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6242-6244.
- Holland, E. C. (2001). "Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models." Nat Rev Genet **2**(2): 120-129.
- Hoppe, B. S., R. B. Jensen, et al. (2000). "Complementation of the radiosensitive M059J cell line." Radiat Res **153**(2): 125-130.

- Hu, J., Y. Mao, et al. (2011). "The profile of Th17 subset in glioma." Int Immunopharmacol **11**(9): 1173-1179.
- Ivanov, S. and A. Linden (2009). "Interleukin-17 as a drug target in human disease." Trends Pharmacol Sci **30**(2): 95-103.
- Iwami, K., A. Natsume, et al. (2011). "Cytokine networks in glioma." Neurosurg Rev **34**(3): 253-263; discussion 263-254.
- Jantaratnotai, N., H. B. Choi, et al. (2009). "ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells." BMC Cancer **9**: 442.
- Karrlander, M., N. Lindberg, et al. (2009). "Histidine-rich glycoprotein can prevent development of mouse experimental glioblastoma." PLoS One **4**(12): e8536.
- Kawaguchi, M., M. Adachi, et al. (2004). "IL-17 cytokine family." J Allergy Clin Immunol **114**(6): 1265-1273; quiz 1274.
- Kehlen, A., K. Thiele, et al. (1999). "Interleukin-17 stimulates the expression of IkappaB alpha mRNA and the secretion of IL-6 and IL-8 in glioblastoma cell lines." J Neuroimmunol **101**(1): 1-6.
- Keime-Guibert, F., O. Chinot, et al. (2007). "Radiotherapy for glioblastoma in the elderly." N Engl J Med **356**(15): 1527-1535.
- Keles, G. E., K. R. Lamborn, et al. (2001). "Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome." J Neurosurg **95**(5): 735-745.
- Khakh, B. S. and R. A. North (2006). "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease." Nature **442**(7102): 527-532.
- Kim, M., L. H. Jiang, et al. (2001). "Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex." EMBO J **20**(22): 6347-6358.
- Lassman, A. B. (2004). "Molecular biology of gliomas." Curr Neurol Neurosci Rep **4**(3): 228-233.
- Laws, E. R., Jr. and M. E. Shaffrey (1999). "The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management." Int J Dev Neurosci **17**(5-6): 413-420.
- Ma, Y., L. Aymeric, et al. (2011). "Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy." J Exp Med **208**(3): 491-503.
- Maniati, E., R. Soper, et al. (2010). "Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment." Oncogene **29**(42): 5653-5662.

- Martin-Villalba, A., A. F. Okuducu, et al. (2008). "The evolution of our understanding on glioma." Brain Pathol **18**(3): 455-463.
- McLaughlin, N., B. Annabi, et al. (2006). "The Survivin-mediated radioresistant phenotype of glioblastomas is regulated by RhoA and inhibited by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate." Brain Res **1071**(1): 1-9.
- Meijer, D. H., C. A. Maguire, et al. (2009). "Controlling brain tumor growth by intraventricular administration of an AAV vector encoding IFN-beta." Cancer Gene Ther **16**(8): 664-671.
- Mendonca, R., L. G. Lima, et al. (2005). "[Primary connus medullaris glioblastoma: case report]." Arq Neuropsiquiatr **63**(2B): 539-542.
- Minniti, G., R. Muni, et al. (2009). "Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents." Anticancer Res **29**(12): 5171-5184.
- Morrone, F. B., A. P. Horn, et al. (2005). "Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity." J Neurooncol **71**(2): 135-140.
- Morrone, F. B., M. C. Jacques-Silva, et al. (2003). "Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines." J Neurooncol **64**(3): 211-218.
- Morrone, F. B., D. L. Oliveira, et al. (2006). "In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model." BMC Cancer **6**: 226.
- Moseley, T. A., D. R. Haudenschild, et al. (2003). "Interleukin-17 family and IL-17 receptors." Cytokine Growth Factor Rev **14**(2): 155-174.
- Noch, E. and K. Khalili (2009). "Molecular mechanisms of necrosis in glioblastoma: the role of glutamate excitotoxicity." Cancer Biol Ther **8**(19): 1791-1797.
- Ohshima, Y., M. Tsukimoto, et al. (2010). "gamma-Irradiation induces P2X(7) receptor-dependent ATP release from B16 melanoma cells." Biochim Biophys Acta **1800**(1): 40-46.
- Okada, H., G. Kohanbash, et al. (2009). "Immunotherapeutic approaches for glioma." Crit Rev Immunol **29**(1): 1-42.
- Oliver, L., C. Olivier, et al. (2009). "Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: regulation and implications for therapy." Curr Mol Pharmacol **2**(3): 263-284.

- Robins, H. I., A. B. Lassman, et al. (2009). "Therapeutic advances in malignant glioma: current status and future prospects." Neuroimaging Clin N Am **19**(4): 647-656.
- Seruga, B., H. Zhang, et al. (2008). "Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer." Nat Rev Cancer **8**(11): 887-899.
- Stagg, J. and M. J. Smyth (2010). "Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer." Oncogene **29**(39): 5346-5358.
- Stupp, R., M. E. Hegi, et al. (2007). "Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions." J Clin Oncol **25**(26): 4127-4136.
- Szabo, A. T. and A. F. Carpentier (2011). "Immunotherapy in human glioblastoma." Rev Neurol (Paris) **167**(10): 668-672.
- Tamajusuku, A. S., E. S. Villodre, et al. (2010). "Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma." J Cell Biochem **109**(5): 983-991.
- Tan, W., W. Huang, et al. (2006). "IL-17 receptor knockout mice have enhanced myelotoxicity and impaired hemopoietic recovery following gamma irradiation." J Immunol **176**(10): 6186-6193.
- Van Meir, E. G., C. G. Hadjipanayis, et al. (2010). "Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma." CA Cancer J Clin **60**(3): 166-193.
- Verkhatsky, A., O. A. Krishtal, et al. (2009). "Purinoceptors on neuroglia." Mol Neurobiol **39**(3): 190-208.
- Virsik-Kopp, P., M. Rave-Frank, et al. (2003). "Role of DNA-PK in the process of aberration formation as studied in irradiated human glioblastoma cell lines M059K and M059J." Int J Radiat Biol **79**(1): 61-68.
- Wainwright, D. A., S. Sengupta, et al. (2010). "The presence of IL-17A and T helper 17 cells in experimental mouse brain tumors and human glioma." PLoS One **5**(10): e15390.
- Wei, J., J. Barr, et al. (2010). "Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression." Clin Cancer Res **16**(2): 461-473.
- Wei, W., J. K. Ryu, et al. (2008). "Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells." Cancer Lett **260**(1-2): 79-87.
- Weller, M. (2011). "Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma." Swiss Med Wkly **141**: w13210.

- White, N. and G. Burnstock (2006). "P2 receptors and cancer." Trends Pharmacol Sci **27**(4): 211-217.
- Wink, M. R., G. Lenz, et al. (2003). "Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines." Cancer Lett **198**(2): 211-218.
- Xu, W., Y. Li, et al. (2010). "Association between EGF promoter polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis." Med Oncol **27**(4): 1389-1397.
- Yamanaka, R. and H. Saya (2009). "Molecularly targeted therapies for glioma." Ann Neurol **66**(6): 717-729.
- Yang, I., N. G. Huh, et al. (2010). "Distinguishing glioma recurrence from treatment effect after radiochemotherapy and immunotherapy." Neurosurg Clin N Am **21**(1): 181-186.
- Zheng, M., S. E. Morgan-Lappe, et al. (2008). "Growth inhibition and radiosensitization of glioblastoma and lung cancer cells by small interfering RNA silencing of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2." Cancer Res **68**(18): 7570-7578.
- Zimmermann, H. (2006). "Ectonucleotidases in the nervous system." Novartis Found Symp **276**: 113-128; discussion 128-130, 233-117, 275-181.
- Zou, W. and N. P. Restifo (2010). "T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol **10**(4): 248-256.