

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**ESTUDO DO PAPEL DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73
NA PROLIFERAÇÃO DE GLIOMAS**

Luci Bavaresco

Orientadora: Dra. Ana Maria Oliveira Battastini

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2008

Às pessoas mais importantes da minha vida:

Meu pai, minha mãe e minha irmã.

**“Nunca conseguiremos encontrar a verdade se nos
contentarmos com aquilo que já foi encontrado”**

Gilbert Torni

AGRADECIMENTOS

À Ana pela orientação e pela oportunidade de realizar o mestrado.

Às minhas amadas bolsistas Lila e Pati pela parceria nos experimentos, por tudo que essa convivência me ensinou e pela nossa amizade.

À Vanessinha pelos momentos inesquecíveis da nossa grande amizade, por todo apoio, compreensão e parceria.

À Elizandra e à Andressa pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

À Angélica e à Gabi pelo carinho, amizade e ajuda no final desta dissertação.

Aos colegas do laboratório 22: Andressa, Angélica, Daiane, Elizandra, Fabrício, Gabriela, Letícia, Liliana e Vanessa, por toda amizade e carinho.

Aos colegas do laboratório 24 agradeço pela amizade, pelos papos e parcerias.

Ao Andrés pela ajuda nos experimentos de citometria de fluxo.

Ao Departamento de Bioquímica, aos professores e funcionários que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, por não terem medido esforços para que eu pudesse estudar.
Pela presença constante e apoio em todos os momentos.

À minha irmã, por todo apoio, companheirismo, carinho e amizade.

À Deus pela coragem, saúde e força.

RESUMO

Os gliomas são os tumores primários mais comuns e devastadores que atingem o sistema nervoso central. O prognóstico para pacientes com estes tumores é ruim, e apesar de intensos esforços para o desenvolvimento de novas terapias, agentes efetivos ainda não estão disponíveis. A ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73) regula os níveis extracelulares de AMP e adenosina, a qual tem sido amplamente descrita como fator indutor de proliferação celular. A ecto-5'-NT/CD73 *per se* tem sido relatada como proteína envolvida no controle dos processos de crescimento, maturação, diferenciação, invasão e migração celular, além do processo de formação de metástases. No presente estudo nós avaliamos a atividade enzimática e as funções da ecto-5'-NT/CD73 durante o processo proliferativo em linhagens de glioma C6 e U138-MG. Os resultados obtidos demonstram que ocorre um aumento da atividade da ecto-5'-NT/CD73 com o aumento da confluência celular, quer seja esta obtida por semeadura de crescentes densidades celulares ou por crescentes dias de cultivo, em ambas as linhagens estudadas. As análises por RT-PCR e citometria de fluxo revelaram um aumento dos níveis de mRNA e proteína da ecto-5'-NT/CD73, respectivamente quando comparadas culturas confluentes com culturas subconfluentes em linhagem de glioma humano U138-MG. Nesta mesma linhagem, o tratamento com 1 μ M de APCP, inibidor competitivo da ecto-5'-NT/CD73 causou uma significativa redução de 20% na proliferação celular, enquanto a adenosina aumentou este processo em 25%. Por outro lado, 1 mM e 3 mM de AMP reduziram a proliferação em 29% e 42% respectivamente. Além disso, o silenciamento estável da ecto-5'-NT/CD73 pela técnica do RNAi reduziu o processo de migração celular na linhagem de glioma humano U138-MG. Em conjunto, Estes resultados sugerem a participação da ecto-5'-NT/CD73 na proliferação celular, sendo este processo desencadeado pela geração de adenosina (fator proliferativo), pela remoção dos níveis citotóxicos de AMP e pela participação *per se* da ecto-5'-NT/CD73 como proteína de adesão.

ABSTRACT

Malignant gliomas are the most common and devastating primary tumors in the central nervous system. Despite treatment, patients with these tumors have a poor prognosis. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73) may regulate the extracellular AMP and adenosine levels, which have been described as proliferation factor. The participation of ecto-5'-NT/CD73 *per se* has been proposed as a proliferative factor, being involved in the control of cell growth, maturation, differentiation, invasion, migration and metastases processes. In the present study, we evaluate the ecto-5'-NT/CD73 activity and functions in rat C6 and human U138-MG glioma cell lines proliferation process. Crescent confluences and culture times leads to an increase on ecto-5'-NT/CD73 activity in both C6 and U138-MG glioma cells. RT-PCR analysis and flow cytometry showed a significant increase on ecto-5'-NT/CD73 mRNA and protein levels respectively, when compared confluent cultures with subconfluent one in human U138-MG glioma cells. Treatment with 1 μ M APCP, a competitive ecto-5'-NT inhibitor, caused a significant reduction in glioma cell proliferation of 20% for U138-MG glioma cell line. In addition, 100 μ M adenosine increases cell proliferation in 25% and AMP 1m M and 3 mM decrease U138-MG glioma cells proliferation in 29% and 42% respectively. The stable silencing of ecto-5'-NT/CD73 by RNAi technique reduces cell migration in human U138-MG glioma cell line. Taken together these results suggest the participation of ecto-5'-NT/CD73 in cell proliferation, being this process dependent of enzymatic activity generating adenosine, a proliferative factor and removing toxic levels of AMP, as well as a function as adhesive molecule.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Os gliomas	11
1.1.1 Aspectos gerais.....	11
1.1.2 Classificação e patologia.....	14
1.1.3 Prognóstico e terapêutica.....	15
1.1.4 Alterações moleculares	16
1.2 Sistema purinérgico	18
1.2.1 Nucleotídeos extracelulares e purinoreceptores	18
1.2.2 A família das ectonucleotidases	19
1.2.3 A ecto 5'-nucleotidase	20
1.2.4 A ecto 5'-nucleotidase e os tumores	21
1.2.5 Adenosina	22
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Reagentes	26
3.2. Manutenção das linhagens celulares.....	26
3.3. Tratamentos.....	27
3.4. Contagem celular.....	27
3.5. Ensaio da atividade da ecto-5'-NT/CD73.....	27
3.6. Dosagem de proteína	28
3.7. RT-PCR	28
3.8. Citometria de fluxo	29

3.9. Silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 pela técnica do RNA de interferência (RNAi)	30
3.10. Ensaio de migração celular	31
3.11. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Capítulo I:	32
4.1.1. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 on cell proliferation of glioma cell lines	32
4.2. Capítulo II:	62
4.2.1. Apresentação dos resultados que não constam no artigo	62
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	76
7. PERSPECTIVAS	77
8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO	78
9. REFERÊNCIAS	79

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADO** - adenosina
- ADP** - adenosina difosfato
- AKT/PKB** - proteína cinase B
- AMP** - adenosina monofosfato
- APCP** - α,β -metileno ADP
- ATP** - adenosina trifosfato
- BHE** - barreira hematoencefálica
- BP** - pares de bases
- BTSC** - célula tronco tumoral cerebral
- cDNA** - DNA complementar
- CMF** - tampão livre de cálcio e magnésio
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- Ecto-5'-NT/ CD73** - ecto 5'-nucleotidase/CD73
- EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético
- EGFR** - receptor do fator de crescimento epidermal
- E-NPP** - ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
- E-NTPDase** - ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolase
- FBS** - soro fetal bovino
- GAPDH** – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GBM** - glioblastoma multiforme
- GPI** - glicosil-fosfatidilinositol
- MAPK** - proteína cinase ativada por mitógenos
- MEC** - matriz extracelular

mRNA - RNA mensageiro

NCS - célula tronco neural

OMS - Organização Mundial da Saúde

P1 - receptor purinérgico metabotrópico para adenosina

P2X - receptor purinérgico ionotrópico

P2Y - receptor purinérgico metabotrópico

p53 - gene supressor tumoral

PBS - tampão fosfato

Pi - fosfato inorgânico

PI3K - fosfatidilinositol 3-cinase

PKC - proteína cinase C

PTEN - proteína fosfatase homóloga da tensina

RNAi - RNA de interferência

PCR - reação em cadeia da polimerase

RISC - complexo silenciador induzido por RNA

SNC - sistema nervoso central

TCA - ácido tricloroacético

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os gliomas

1.1.1 Aspectos gerais

Os gliomas são os tumores primários mais comuns e devastadores que atingem o sistema nervoso central (SNC) de humanos (Dai & Holland, 2001), representando cerca de 80% das neoplasias cerebrais malignas (Sathornsumetee *et al.*, 2007; Schwartzbaum *et al.*, 2006). Uma das principais características destes tumores é o seu elevado grau de proliferação e invasividade. Como consequência, os pacientes apresentam um grande comprometimento do tecido nervoso adjacente ao foco tumoral com o desenvolvimento de sintomas que incluem cefaléia, mudanças cognitivas, convulsões, fraqueza, náusea e vômitos (DeAngelis, 2001; Holland, 2001). Os fatores de risco associados à neurocarcinogênese incluem exposição a compostos N-nitroso, espécies reativas do oxigênio, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, altas doses de quimoterápicos e principalmente exposição a altas doses de radiação ionizante (Schwartzbaum *et al.*, 2006; DeAngelis, 2001). Gliomas são usualmente detectados por tomografia computadorizada e por ressonância magnética (Holland, 2001).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), nos Estados Unidos são estimados 18.500 novos casos de tumores cerebrais primários por ano com aproximadamente 13.000 mortes. A incidência aumenta 0,9% ao ano,

provavelmente devido à melhoria da qualidade do diagnóstico por imagem (Schwartzbaum *et al.*, 2006).

O termo glioma refere-se a todas as neoplasias originadas de células gliais ou precursores gliais (Schwartzbaum *et al.*, 2006), incluindo tumores constituídos de células com características de astrócitos (astrocitomas), oligodendrócitos (oligodendrogliomas), células ependimais (ependimomas) e misturas de vários tipos de células gliais (por exemplo, oligoastrocitomas), conforme descrito na tabela 1 (Sanai *et al.*, 2005).

Tabela 1: Células neurais: principais funções e tumores associados. Retirado de Sanai *et al.*, 2005.

Table 1. Cell Types and Associated Tumors of the Central Nervous System.		
Cell Type	Function	Associated Tumors
Astrocyte	Provides nutrition, insulation, and structural support for neurons	Astrocytoma Pilocytic astrocytoma Diffuse astrocytoma Anaplastic astrocytoma Glioblastoma Oligoastrocytoma Pleomorphic xanthoastrocytoma Subependymal giant-cell astrocytoma
Neuron	Conducts electrical signals within neural systems	Ganglioglioma Gangliocytoma Central neurocytoma
Oligodendrocyte	Provides insulation to neuronal axons to facilitate signal conduction	Oligodendroglioma Oligoastrocytoma
Ependymal cell	Forms lining of the ventricular system	Ependymoma

Embora a transformação neoplásica de células gliais diferenciadas seja tradicionalmente assumida como um mecanismo da gliomagênese, recentemente foi demonstrado que células tronco podem estar envolvidas neste processo (Reya *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2004; Kondo, 2006), conforme demonstrado na figura 1. As células tronco neurais são reguladas pelas mesmas vias de sinalização celular que estão ativas em muitos tumores cerebrais, conseqüentemente, elas são

capazes de exibir comportamentos característicos de gliomas, como alta habilidade proliferativa (Singh *et al.*; Fomchenko & Holland, 2006), elevada motilidade, associação com vasos sanguíneos, progressão com fenótipos antigênicos de células imaturas como a expressão de nestina e do marcador de células tronco neurais CD133 (Shoshan *et al.*, 1999; Doetsch *et al.*, 2002; Sanai *et al.*, 2005). Desta forma, os gliomas são constituídos por populações de células heterogêneas contendo uma maior quantidade de células diferenciadas e uma minoria de células tumorigênicas indiferenciadas multipotentes (Fomchenko & Holland, 2006). Embora ambas contenham mutações oncogênicas que poderão resultar na tumorigênese, somente as células tronco neurais tumorigênicas tem capacidade de se autorenovar gerando assim a propagação tumoral (Zheng *et al.*, 2007).

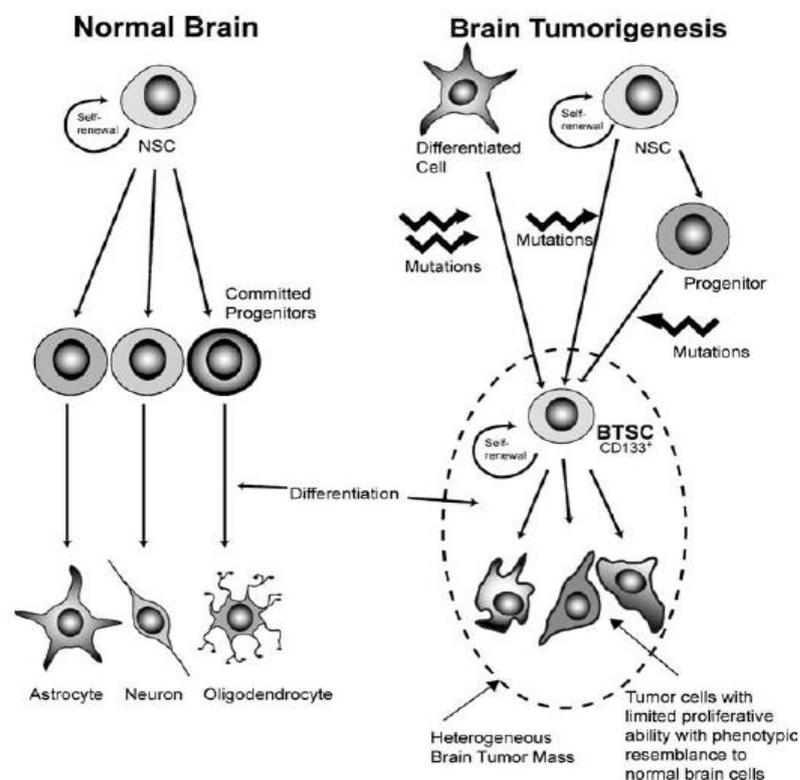


Figura 1: Possíveis origens dos gliomas. Retirado de Singh *et al.*, 2004. (NCS= célula tronco neural e BTSC= célula tronco tumoral cerebral)

1.1.2 Classificação e patologia

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os gliomas em 4 graus de malignidade (I a IV), de acordo com critérios histopatológicos: morfologia celular, proliferação microvascular, atividade mitótica e necrose (Kleihues *et al.*, 2002). Os gliomas de grau I são tumores geralmente benignos. Os astrocitomas de baixo grau (grau II) podem aparecer em qualquer região do sistema nervoso central e infiltram-se difusamente no parênquima cerebral. Os astrocitomas anaplásicos (grau III) são caracterizados por astrócitos fibrilares ou gemistocíticos, podendo progredir rapidamente a glioblastoma. A forma mais maligna é o glioblastoma multiforme (GBM), que possui grau IV e é um dos cânceres humanos mais agressivos, com uma sobrevivência média inferior a um ano, sendo que esta estatística não se modificou significativamente nas últimas 2 décadas (Holland, 2001; Maher *et al.*, 2001). OS GBM representam cerca de 40% do total de casos de gliomas (Miller & Perry, 2007), sendo quase sempre infiltrativos e comumente apresentam características multifocais (Dai & Holland, 2001). Tais tumores são formados por uma massa intraparenquimal heterogênea que evidencia áreas de necrose e hemorragia. Microscopicamente, o tumor consiste em diferentes tipos celulares: células próprias do glioma, células endoteliais hiperproliferativas, macrófagos e células normais de áreas do cérebro que estão sendo invadidas pelo glioma. Entre as características histológicas mais comuns do GBM, incluem-se regiões de necrose rodeadas por células de arquitetura pseudopaliçada, vasos sanguíneos hipertrofiados no interior e em áreas adjacente ao tumor e grande pleomorfismo nuclear. O GBM pode tanto ter origem *de novo*, como ser resultado da progressão de um glioma de baixo grau e raramente gera metástases periféricas (Mourad *et al.*, 2005).

1.1.3 Prognóstico e terapêutica

O prognóstico para pacientes com glioma é ruim e, apesar de intensos esforços para o desenvolvimento de novas terapias, agentes efetivos ainda não estão disponíveis (Konopka & Bonni, 2003). O tempo médio de sobrevivência é relacionado com a idade do paciente no momento do diagnóstico e o grau do tumor (Schwartzbaum *et al.*, 2006). Na figura 2 estão descritos os tipos histológicos de tumores cerebrais e a porcentagem relativa de sobrevivência dos pacientes, ressaltando que a menor sobrevida ocorre em pacientes com GBM, aquele classificado como grau IV por apresentar maior malignidade.

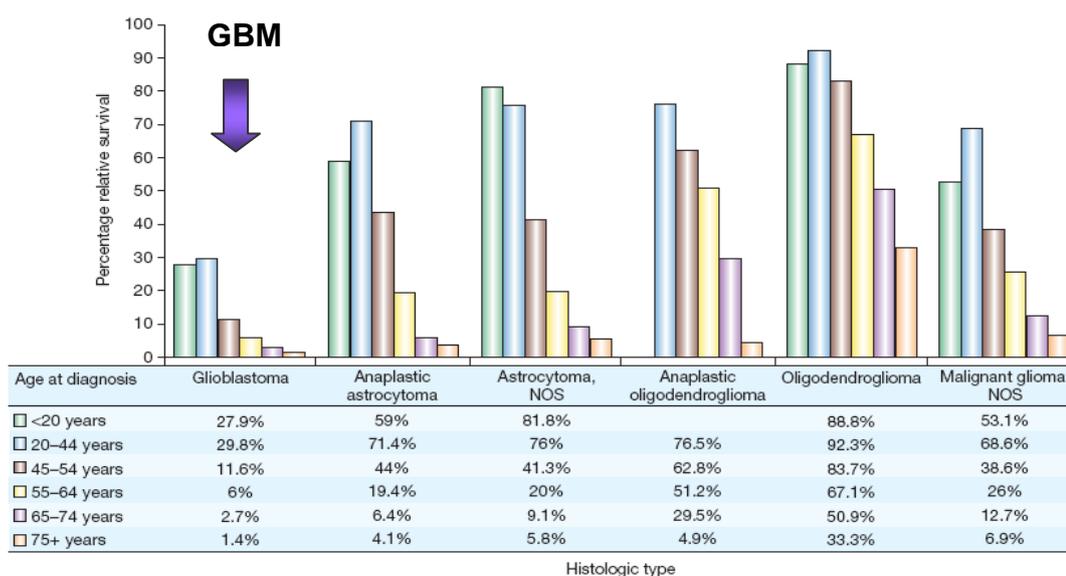


Figura 2: Idade de ocorrência dos gliomas e sobrevida do pacientes.

Adaptado de Schwartzbaum *et al.*, 2006.

A cirurgia é o tratamento de escolha para os pacientes com gliomas, entretanto, a ressecção completa do tumor é limitada pela alta invasividade das células tumorais nos tecidos normais circundantes (Grobben *et al.*, 2002; Behin *et al.*, 2003). Portanto, a maioria dos pacientes é tratada com radioterapia e/ou

quimioterapia pós-operatória (Mazeron & Kantor, 1998). Contudo, estes agentes demonstram eficácia limitada, principalmente pela ausência de especificidade terapêutica das drogas citotóxicas contra tais neoplasias, da quimioresistência intrínseca destes tumores, da baixa tolerância do tecido normal aos efeitos tóxicos decorrentes da terapia (Mousseau *et al.*, 1993) e também devido às restrições impostas pela barreira hematoencefálica (BHE) (Brandes *et al.*, 2000). Assim apenas fármacos altamente lipofílicos como a temozolomida e nitrosuréis podem ser utilizados (Mousseau *et al.*, 1993). Nos últimos anos, a quimioterapia com emprego da temozolomida tem prolongado significativamente a vida dos pacientes com gliomas (Norden & Wen, 2006; Stupp *et al.*, 2007). Contudo, a recorrência do tumor é quase inevitável, uma vez que a remoção cirúrgica do tumor invariavelmente deixa no tecido normal uma população de células tumorais ou de células tronco neurais tumorigênicas na forma quiescente, podendo gerar recorrência de uma forma mais agressiva que o tumor original (Fomchenko & Holland 2006).

1.1.4 Alterações moleculares

A tumorigênese envolve o descontrole das funções de proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Tais genes codificam proteínas reguladoras de complexas rotas de transdução de sinal envolvidas em funções celulares essenciais, tais como: proliferação, diferenciação, apoptose, adesão, migração e angiogênese (Weinberg, 1995).

Alterações na expressão de muitos genes e anormalidades cromossômicas são comumente encontradas em gliomas e, na maioria dos casos, essas

mutações estão correlacionadas com o grau clínico do tumor. No GBM, várias proteínas têm sido relacionadas ao processo neoplásico. Dentre as principais, destacam-se as MAPK (proteínas cinases associadas à mitógenos) (Bredel & Pollack, 1997), a PKC (proteína cinase C) (Bredel & Pollack, 1999), a PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase) e a AKT/PKB (proteína cinase B) (Schelegel *et al.*, 2000). Outra proteína importante envolvida na gliomagênese é a PTEN (proteína fosfatase homóloga da tensina), a qual apresenta um importante papel como supressora tumoral e está freqüentemente mutada ou deletada em GBM (Sano *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1998). A perda da expressão da PTEN resulta em ativação da AKT/PKB, uma enzima envolvida nas vias centrais de sobrevivência celular, constitutivamente ativa (Holland, 2001). Outra característica importante dos GBMs é a deleção do gene supressor tumoral, *p53*, um fator de transcrição que regula a progressão do ciclo celular e apoptose (Bogler *et al.*, 1999). A amplificação e ativação de mutações no gene que codifica o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), também têm sido observadas. Quase todas essas mutações resultam em alteração na regulação da parada do ciclo celular. A soma dos efeitos provocados por essas alterações contribui para a biologia desses tumores (Holland, 2001).

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens celulares de gliomas U138-MG, derivada de glioma humano de ocorrência espontânea e C6, derivada de glioma induzido por tratamento com N-nitroso-metiluréia em rato. Estas linhagens apresentam características semelhantes às descritas para os GBM e são amplamente utilizadas como modelos destes tumores para estudos *in vitro*.

1.2 Sistema purinérgico

1.2.1 Nucleotídeos extracelulares e purinoreceptores

As purinas e pirimidinas extracelulares são mensageiros amplamente distribuídos no organismo, responsáveis por diversos efeitos biológicos mediados pelos purinoreceptores (Ralevic & Burnstock, 1998). Dentre os principais efeitos desses nucleotídeos no meio extracelular pode-se destacar: neurotransmissão, neuromodulação, contração muscular, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dor e modulação da função cardíaca (Burnstock, 2004). Além disso, estas moléculas podem atuar como fatores tróficos, regulando o desenvolvimento e a manutenção do sistema nervoso e sua resposta a doenças e injúrias (Neary *et al.*, 1996; Rathbone *et al.*, 1999; Ciccarelli *et al.*, 2001). No SNC as principais fontes de purinas extracelulares são os neurônios, a glia, a microglia, as células endoteliais e o sangue. Os receptores que ligam nucleotídeos e nucleosídeos são divididos em receptores P1 e P2, como apresentado na Tabela 2.

Estudos têm demonstrado que o ATP extracelular é capaz de promover a proliferação celular em astrócitos (Rathbone *et al.*, 1992; Neary *et al.*, 1994). Além disso, em trabalho realizado previamente pelo nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que o ATP e a adenosina (Ado) estimulam a proliferação de linhagens celulares de gliomas (Morrone *et al.*, 2003). Desta forma, o conjunto destes dados demonstra a importância destas moléculas durante o processo proliferativo das células neurais.

Tabela 2. Receptores de purinas e pirimidinas. Adaptado de Ralevic & Burnstock, 1998.

Receptores P1		Receptores P2	
ligante natural	adenosina	ATP, ADP, UTP e UDP	
tipo	acoplado à proteína G	canal iônico	acoplado à proteína G
subgrupo	-	P2X	P2Y
subtipos	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃	P2X ₁₋₇	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃ , P2Y ₁₄

1.2.2 A família das ectonucleotidases

Uma vez liberados no meio extracelular, e após interagir com seus receptores específicos, os nucleotídeos são finalmente são hidrolisados por ação de ectoenzimas até os seus respectivos nucleosídeos (Zimmerman, 1994). A “via das ectonucleotidases”, que apresenta um papel chave na regulação da sinalização purinérgica controlando a concentração dos nucleotídeos e nucleosídeos, é constituída pelas seguintes enzimas: E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfatodifosfodrolase), as E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase) e as fosfatases alcalinas, que atuam degradando o ATP e o ADP, além da ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73), que catalisa

a última etapa dessa via, hidrolisando o AMP até adenosina (Zimmermann, 2001). Em nosso laboratório, temos estudado, em linhagens de glioma, especialmente as E-NTPDases e a ecto-5'-NT/CD73, as quais tem sua expressão e atividade enzimática alteradas em relação às células normais.

Os membros da família E-NTPDases constituem uma classe de ectoenzimas ancoradas à membrana plasmática via domínios hidrofóbicos, com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Essas enzimas são caracterizadas entre outras funções pela sua capacidade de hidrolisar nucleotídeos tri- e difosfatados (Plesner, 1995). Em mamíferos, já foram clonados e classificados 8 membros dessa família de ectoenzimas, nomeados NTPDase1-8, os quais apresentam uma ampla diversidade de preferência por substrato.

1.2.3 A ecto 5'-nucleotidase

A ecto-5'-NT/CD73 é um homodímero ligado à membrana plasmática através de uma âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol (GPI), responsável pela desfosforilação de ribo- e desoxiribonucleosídeos 5'-monofosfatados a seus correspondentes nucleosídeos (Zimmermann, 2001). Esta enzima é um ponto chave na via das ectonucleotidases, sendo a principal fonte enzimática de adenosina no meio extracelular (Zimmermann, 1992). Sua atividade catalítica é potencializada por cátions divalentes, principalmente o Mg^{2+} , e inibida por ADP, ATP e 5'- α,β - metileno-ADP (APCP).

A ecto-5'-NT/CD73 é essencial no desenvolvimento e sobrevivência de células neurais (Heilbronn *et al.*, 1995) e encontra-se amplamente expressa em vários tecidos. No SNC está predominantemente associada às células gliais,

tendo sido identificada na membrana plasmática de astrócitos, oligodendrócitos, microglia e gliomas (Zimmermann, 2006).

1.2.4 A ecto 5'-nucleotidase e os tumores

A ecto-5'-NT/CD73 é altamente expressa na maioria dos tumores sólidos e seu nível de expressão está associado com a neovascularização, invasividade e metástases, indicando baixo tempo de sobrevivência para o paciente (Spychala 2000). A expressão aumentada da ecto-5'-NT/CD73 já foi descrita em cânceres de mama, cólon, estômago, pâncreas, leucemia mielóide crônica, linfoma, melanoma, carcinoma de Walker 256 e glioblastoma. Além disso, o nível da atividade enzimática mostra uma elevada correlação com a localização e o grau do tumor (Spychala 2000). Por exemplo, em melanomas e tumores de mama, o aumento da expressão da ecto-5'-NT/CD73 indica um maior grau de invasividade e capacidade metastática, ressaltando a importância desta molécula na proliferação e motilidade tumoral (Sadej *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

A ecto-5'-NT/CD73 apresenta várias funções não relacionadas com sua atividade enzimática, estando envolvida em interações célula-célula e célula-matriz extracelular, em eventos de migração e adesão celular (Fastbom *et al.*, 1987; Schoen *et al.* 1988; Vogel *et al.*, 1991), bem como nos mecanismos que induzem a resistência a drogas (Ujházy *et al.*, 1996). Adicionalmente, ela tem sido relatada como proteína envolvida na motilidade celular (Ludwing *et al.*, 1999), molécula de adesão (Airas *et al.*, 1995), na proliferação e ativação de linfócitos e na adesão dos mesmos ao endotélio (Airas *et al.*, 1997). Um papel similar da ecto-5'-NT/CD73 foi proposto na promoção da adesão e invasividade de

glioblastomas humanos (Fenoglio *et al.*, 1997). Dados prévios da literatura demonstram modificações nesta atividade enzimática em diferentes estágios de confluência de células de glioblastoma em cultura, sugerindo que o aumento desta atividade poderia estar correlacionado com a proliferação celular (Turnay *et al.*, 1989). Além disso, a superexpressão da enzima aumenta a migração, adesão e invasão de tumores de mama (Wang *et al.*, 2007). Estes efeitos ocorrem por ação conjunta da atividade enzimática, ou seja, pela formação do produto adenosina, além da presença da enzima como proteína de adesão. Recentemente foi mostrado que, de forma similar, o silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 reduz as características tumorais malignas de invasão e propagação tumoral (Zhi *et al.*, 2007). Portanto, a ecto-5'-NT/CD73 é uma proteína reconhecidamente envolvida no processo proliferativo em células tumorais tornando-se uma forte candidata a marcador de agressividade (Spychala *et al.*, 2004) e progressão tumoral além de ser um potencial alvo terapêutico (Zhou *et al.*, 2007).

1.2.5 Adenosina

A adenosina, produto ecto-5'-NT/CD73, é considerada um importante neuromodulador, podendo exercer vários efeitos através da interação com receptores específicos da família P1 (Tabela 1). Vários estudos demonstraram os efeitos deste nucleosídeo na regulação do ciclo celular, proliferação e apoptose de células de origem tumoral e não-tumoral, podendo exercer efeito inibidor ou promotor da proliferação celular (Ceruti *et al.*, 2000; Ohana *et al.*, 2001; Peyot *et al.*, 2000). O efeito da adenosina na proliferação celular depende de sua

concentração extracelular, do subtipo de receptor presente na membrana, e dos mecanismos de transdução de sinais por eles ativados (Fredholm *et al.*, 2001; Merighi *et al.*, 2003). Contudo, a adenosina é amplamente conhecida pelas funções citoprotetoras e proliferativas, angiogênese, propriedades imunossupressoras que em conjunto promovem a progressão tumoral (Figura 3). Dessa forma, mecanismos que controlam a concentração dessas substâncias, como os que ocorrem via ectonucleotidases, principalmente via ecto-5'-NT/CD73, apresentam um papel fundamental para a célula.

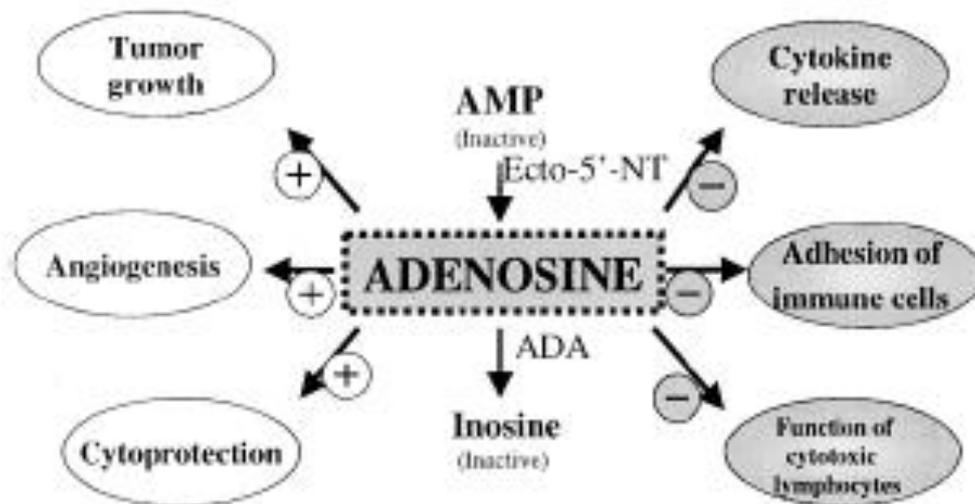


Figura 3: Funções promotoras tumorais da adenosina. Retirado de Spychala 2000.

Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram fortes evidências de que a sinalização purinérgica está envolvida no crescimento e na progressão dos gliomas: i) gliomas apresentam alterações no metabolismo extracelular de nucleotídeos, exibindo uma baixa atividade ATPásica e uma elevada atividade AMPásica, comportamento oposto aos astrócitos (Wink *et al.*, 2003); ii) ATP e adenosina extracelulares induzem estímulo proliferativo em diferentes culturas de

gliomas (Morrone *et al.*, 2003); iii) ao contrário do tecido cerebral normal, gliomas apresentam uma clara resistência à morte induzida por concentrações citotóxicas de ATP (Morrone *et al.*, 2005); iv) A co-injeção de células de glioma com apirase, enzima que hidrolisa ATP/ADP, em modelo de glioma *in vivo* resultou numa diminuição do volume e das características de malignidade desses tumores (Morrone *et al.*, 2006). Dessa forma, alterações no metabolismo do ATP e dos seus metabólitos, envolvendo a atividade da ecto-5'-NT/CD73 podem ser uma característica desse tipo de tumor e possivelmente representam um importante mecanismo de invasão e proliferação.

2. OBJETIVOS

Esta dissertação será apresentada na forma de capítulos, que visam atingir os seguintes objetivos:

Capítulo I:

- Investigar o papel da ecto-5'-NT/CD73 no processo de proliferação celular em linhagens de glioma;
- Estudar o efeito do substrato (AMP) e do produto (adenosina) da ecto-5'-NT/CD73 sobre a proliferação celular de linhagem de glioma.

Capítulo II:

- Caracterizar as linhagens de glioma humano U138-MG e C6 de rato após o processo de silenciamento estável da ecto-5'-NT/CD73 pela técnica do RNA de interferência (RNAi);
- Avaliar o efeito do silenciamento da expressão da ecto-5'-NT/CD73 sobre a migração celular de linhagem de glioma humano U138-MG.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

O meio de cultura DMEM, os antibióticos penicilina/estreptomicina e a tripsina/EDTA foram obtidos da Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). APCP (α,β -metileno ADP), DMSO (dimetilsulfóxido), AMP e adenosina foram obtidos da Sigma (Sigma, St. Louis, USA). O soro fetal bovino (FBS) foi obtido da Cultilab (Cultilab, Campinas, SP, Brazil). Os dNTPs, o *random primer*, a taq polimerase e a transcriptase reversa foram obtidos da Promega (Promega, Madison, Wisconsin, USA). O reagente Trizol e os oligonucleotídeos foram obtidos pela Invitrogen (Invitrogen Co., Carlsbad, California, USA). Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau analítico.

3.2. Manutenção das linhagens celulares

As linhagens de gliomas U138-MG e C6 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). As células foram mantidas em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contendo 0,5 U/mL de penicilina/estreptomicina, suplementado com 15% (U138-MG) ou 5% (C6) de soro fetal bovino. As células foram mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Todos os experimentos foram realizados utilizando culturas mantidas em meio suplementado com soro fetal bovino.

3.3. Tratamentos

O inibidor competitivo da ecto-5'-NT/CD73, APCP (α,β -metileno ADP), foi dissolvido em DMSO e, após as culturas atingirem a semiconfluência as células de gliomas foram tratadas com 1 μ M de APCP por 48 h. Células controles foram tratadas com DMSO (concentração final de 0,2%) nas mesmas condições.

Os tratamentos com AMP ou adenosina foram realizados de forma semelhante, onde culturas em semiconfluência foram tratadas com AMP (50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM e 3 mM) ou adenosina 100 μ M por 48 h. Células controle sem tratamento foram processadas paralelamente nas mesmas condições.

3.4. Contagem celular

Ao final das diferentes condições de cultivo (crescentes dias e confluências) e dos diferentes tratamentos, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS e em seguida soltas com tripsina/EDTA 0,25%. Após, esta foi inativada pela adição de DMEM suplementado com soro fetal bovino e as células foram imediatamente contadas em hemocitômetro.

3.5. Ensaio da atividade da ecto-5'-NT/CD73

Após as diferentes condições de cultivo e tratamento, as células de gliomas foram lavadas com meio de incubação livre de fosfato e a reação foi iniciada pela adição de 200 μ L de meio de incubação contendo 2 mM de $MgCl_2$, 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM de glicose, 20 mM de hepes, pH 7.4 e 2 mM de AMP a 37°C. Após 10 minutos de incubação a reação foi parada pela transferência de

uma alíquota do meio da reação para TCA 10% a 4°C. O fosfato inorgânico liberado (Pi) foi medido através do método do verde de malaquita (Chan *et al.*, 1986), usando KH₂PO₄ como padrão. A liberação não enzimática de Pi no meio de cultura sem células foi subtraída do Pi total liberado durante a incubação. A atividade específica foi expressa em nmol Pi/min/mg de proteína.

3.6. Dosagem de proteína

As células foram solubilizadas com 100 µL de NaOH 1 M e congeladas por 24 h. Uma alíquota foi retirada para dosagem da proteína pelo método de azul de comassie (Bradford, 1976) utilizando-se albumina bovina como padrão.

3.7. RT-PCR

O RNA total das células U138-MG de glioma humano e C6 de glioma de rato foi isolado em trizol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen Co., Carlsbad, California, USA). O cDNA foi sintetizado através da reação da transcriptase reversa a partir de 5 µg de RNA em um volume final de 25 µL utilizando-se *random primer* de acordo com as instruções do fabricante (Promega, Madison, Wisconsin, USA). A reação foi processada durante 1 h a 37°C e parada com refrigeração a 4°C. Em seguida, 3,0 µL da mistura da reação foi usada na reação em cadeia da polimerase (PCR) em volume total de 20 µL, usando 50 µM de dNTP e 1 U de taq polimerase em meio de reação suplementado contendo 0,5 µM de *primer* para CD73, GAPDH ou β-actina. As condições do PCR foram: 1 min a 95°C, 1 min a 94°C, 1 min a 52°C (temperatura de anelamento para os *primers*

utilizados para a linhagem de humanos) e/ou 60°C (temperatura de anelamento para os *primers* utilizados para a linhagem de rato) e 1 min a 72°C com repetições de 35 ciclos mais 10 min de extensão a 72°C. O produto de reação do PCR (10 µL) foi separado em gel de agarose 1,5%. Os *primers* utilizados foram: para ecto-5'-NT/CD73 de rato; 5'CCC GGG GGC CAC TAG CAC CTC A3' e 5'GCC TGG ACC ACG GGA ACC TT3' (produto de amplificação de 410 pares de bases); para a β-actina; 5'TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG3' e 5'TAC TCC TGC TTC CTG ATC CAC AT3' (produto de amplificação de 210 pares de bases); para ecto-5'-nucleotidase/CD73 de humano: 5'GAT CGA GCC ACT CCT CAA A 3' e 5'GCC CAT CAT CAG AAG TGA C3' (produto de amplificação de 437 pares de bases) e para GAPDH: 5'CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC3' e 5'CCA TGG AGA AGG CTG GGG 3' (produto de amplificação de 195 pares de bases). Controles negativos foram realizados utilizando água destilada autoclavada no lugar dos respectivos cDNAs. A expressão do mRNA da ecto-5'-nucleotidase foi determinada avaliando a razão da intensidade da banda da ecto-5'-nucleotidase para GAPDH para a linhagem U138-MG ou β-actina para a linhagem C6.

3.8. Citometria de fluxo

As células de glioma U138-MG foram crescidas até alcançarem diferentes confluências. Após, o meio foi removido e as células foram tripsinizadas, dissociadas e contadas em hemocítômetro. 1×10^6 células foram centrifugadas, lavadas com PBS e incubadas com anticorpo anti CD73 de humanos marcado com ficoeritrina (IgG₁[PE]) (1:10) durante 1 h a 4°C. Paralelamente, foram processadas amostras nas mesmas condições, sem adição de anticorpo. Após a

incubação, as células marcadas e não marcadas foram misturadas e analisadas no citômetro de fluxo (FACS Calibur-BD Biosciences). Os resultados foram analisados utilizando-se o Winndi and Cychred software (University of Wales College of Medicine, Cardiff, UK) e mostrados como razão de células marcadas/não marcadas.

3.9. Silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 pela técnica do RNA de interferência (RNAi)

Células Hek 293t (empacotadoras de vírus) foram transfectadas com Superfect (Quiagen) em placa de 6 poços com os plasmídeos de empacotamento de vírus (RRE , Rev e VSVG), além do plasmídeo de interesse contendo a seqüência comercial de RNAi da ecto-5'-NT/CD73 (Mission Sigma- Aldrich). As seqüências usadas foram: 5'-CCTCTCAATCATGCCGCTTTA-3' denominada de C4 e 5'-GCACTGGGAAATCATGAATTT-3', denominada C6. A seqüência denominada Ci é uma seqüência '*non-target*', a qual não deveria silenciar nenhum mRNA. Quarenta e oito horas após a transfecção, o sobrenadante viral das células Hek 293t transfectadas foi filtrado em membrana de 45 µM (para retirar possíveis células Hek empacotadoras contidas no meio viral). O sobrenadante viral filtrado foi colocado sobre as células alvo (linhagem de glioma C6 ou U138-MG), contendo 8 µg/µL de polybreno (reagente que auxilia na transdução viral) durante a noite. Aproximadamente 72 h após a transdução iniciou-se a seleção com 30 µM de puomicina por 10 dias, uma vez que a sequêcia viral inserida no genoma possui uma parte que confere resistência à puomicina. Testes anteriores demonstraram que estas condições de tratamento com puomicina eliminaram

completamente as células não transduzidas. Os experimentos de transdução viral e silenciamento da ecto-5'-NT foram realizados pela equipe do laboratório do Dr. Guido Lenz do Departamento de Biofísica da UFRGS.

3.10. Ensaio de migração celular

Os ensaios de migração celular foram realizados conforme descrito por Valster e colaboradores (Valster *et al.*, 2005). Resumidamente, as células da linhagem U138-MG foram semeadas na densidade de 20.000 células/poço em placas de 12 poços e crescidas até a confluência em DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino. Após, as células foram lavadas com CMF (tampão livre de cálcio e magnésio) e com o auxílio de uma ponteira foi feita uma fenda na monocamada de células, gerando a separação das mesmas. O meio de cultivo foi recolocado e a migração celular fotografada ao microscópio nos tempos de 0, 12, 24, 36 e 48 horas. Posteriormente o espaço migrado, em micrômetros, foi quantificado e representado como % de espaço a ser migrado pelas células.

3.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey ou através do teste T de Student. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Capítulo I:

4.1.1. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 on cell proliferation of glioma cell lines

Artigo submetido à revista Molecular and Cellular Biochemistry.

THE ROLE OF ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 IN GLIOMA CELL LINE PROLIFERATION

Luci Bavaresco¹, Angélica Regina Cappellari¹, Andressa Bernardi¹, Elizandra Braganhol¹, Liliana Rockembach¹, Patrícia Fernandes Farias¹, Márcia R. Wink²,
Andrés Delgado-Cañedo³ and Ana Maria Oliveira Battastini^{1*}

¹ *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

² *Departamento de Bioquímica, Ciências Fisiológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.*

³ *Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular, Instituto de Cardiologia de Porto Alegre, RS, Brazil.*

* Corresponding author:

Ana Maria Oliveira Battastini

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos, 2600-anexo, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone number: 55 (51) 3308-5554

FAX number: 55 (51) 3308-5535

e-mail: abattastini@terra.com

Abstract

Malignant gliomas are the most common and devastating primary tumors in the brain and, despite treatment, patients with these tumors have a poor prognosis. The participation of ecto-5'-NT/CD73 *per se* as a proliferative factor, being involved in the control of cell growth, maturation, differentiation, invasion, migrations and metastasis processes has been previously proposed. In the present study, we evaluated the activity and functions of ecto-5'-NT/CD73 during the proliferation process of rat C6 and human U138-MG glioma cell lines. Increasing confluences and culture times led to an increase in ecto-5'-NT/CD73 activity in both C6 and U138-MG glioma cells. RT-PCR analysis and flow cytometry showed a significant increase in ecto-5'-NT/CD73 mRNA and protein levels, respectively, comparing confluent with sub-confluent cultures in human U138-MG glioma cells. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73) may regulate the extracellular AMP and adenosine levels, which have been described as a proliferative factor. Treatment with 1 μ M APCP, a competitive ecto-5'-NT/CD73 inhibitor, caused a significant reduction of 20% in U138-MG glioma cell proliferation. In addition, 100 μ M adenosine increases cell proliferation by 25%. AMP (1mM and 3mM) decreased U138-MG glioma cell proliferation by 29% and 42%, respectively. Taken together, these results suggest the participation of ecto-5'-NT/CD73 in cell proliferation and that this process is dependent upon the enzyme's production of adenosine, a proliferative factor, and removal of AMP, a toxic molecule for gliomas.

Keywords: Ecto-5'-nucleotidase/ CD73, glioma cells, cell proliferation.

1. Introduction

Gliomas are the main primary central nervous system (CNS) tumors in humans, accounting for almost 80% of brain malignancies [1]. Glioblastoma multiforme (GBM), classified with a grade 4, represents the most aggressive of these tumors [2]. Despite considerable progress in research regarding the molecular aspects of malignant gliomas, the prognosis of these tumors continues to be dismal [3]. Multimodal combinations of target agents with radiation and chemotherapy may enhance treatment efficacy [4], but despite these treatments, gliomas recur early due to their high proliferation, infiltrative and invasive behaviors [5, 6].

Glioma progression is a combination of overactivated signaling pathways that control normal cell growth, aberrant expression of cellular oncogenes and deletion of tumor suppressor genes [7, 8]. It has traditionally been thought that brain tumors arise from differentiated neural cells, however, since neural stem cells have been discovered in the adult CNS, it has been speculated that these cells might be a principal target of mutations, with consequent transformation [9, 10].

Ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT/CD73) is a widely-distributed enzyme anchored on the outer surface of the plasma membrane via a glycosyl phosphatidylinositol linkage. The enzyme produces nucleosides from non-cyclic nucleoside monophosphates, particularly adenosine 5'-monophosphate (AMP), in the extracellular space. Ecto-5'-NT/CD73 is expressed in many different tissues [11], with an intracellular localization also being described [12]. A role for the enzyme as a proliferative factor has been proposed and the protein is involved in

the control of cell growth, maturation and differentiation processes [13, 11, 14]. Previous studies indicate the involvement of ecto-5'-NT/CD73 in cell-cell and cell-matrix interactions [15, 16, 17, 18], in drug resistance [19] and tumor-promoting functions [20]. Ecto-5'-NT/CD73 is highly expressed in many human solid tumors, and the level of this expression has been associated with tumor neovascularization, invasiveness, metastasis and with shorter patient survival time [20]. In addition, the levels of ecto-5'-NT/CD73 show significant correlation with tumor grade and localization [21].

Adenosine, the product of ecto-5'-NT/CD73 activity, elicits important physiological responses related to neurotransmission modulation, neuroprotection and cell survival/death [22]. In addition, adenosine could mediate cell signaling in physiological, as well as, pathological conditions [23], including regulation of tumorigenesis [24]. Morrone and collaborators [25] demonstrated that adenosine can act as a proliferative factor for glioma cells in culture. These effects are closely related to extracellular adenosine concentrations, cell surface expression of different adenosine receptor subtypes and signal transduction mechanisms activated following the binding of specific agonists [26]. As such, although the role of adenosine in tumorigenesis has been extensively studied, the effect of AMP on cell proliferation of gliomas remains unclear.

Considering the important role of ecto-5'-NT/CD73 as an adhesion/migration protein and as the main source of extracellular adenosine from AMP hydrolysis, in the present study we evaluated the involvement of ecto-5'-NT/CD73 in glioma cell line progression, as well as the effect of its substrate, AMP, and its product, adenosine, on cell proliferation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Cell culture medium, penicillin/streptomycin and trypsin/ EDTA solution were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). APCP (α,β -methylene ADP), DMSO (dimethylsulphoxide), AMP and adenosine were obtained from Sigma (Sigma, St. Louis, USA). Fetal bovine serum was purchased from Cultilab (Cultilab, Campinas, SP, Brazil). dNTPs, random primer, Taq polymerase and reverse transcriptase were purchased from Promega (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Trizol LS reagent and oligonucleotides were obtained from Invitrogen (Invitrogen Co., Carlsbad, California, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

2.2. Maintenance of cell line and treatment

The human glioblastoma cell line U138-MG (derived from spontaneously occurring human malignant gliomas) and the rat glioma cell line C6 (derived from N-nitrosomethylurea-induced glioma in rat) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). The cells were grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.5 U/mL penicillin/streptomycin antibiotics, and supplemented with 5% (C6) or 15% (U138-MG) (v/v) fetal bovine serum (FBS). Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air. All the

experiments of this study were conducted in serum supplemented DMEM. Glioma cells were seeded according to each experiment.

APCP (α,β -methylene ADP) was dissolved in cell culture-grade dimethylsulphoxide (DMSO). After reaching semi-confluence, U138-MG cells were exposed to 1 μ M APCP for 48 h. Control cells were treated with vehicle. Similarly, for treatment with adenosine and AMP, semi-confluent cells were incubated with 100 μ M adenosine or AMP (50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1mM or 3mM) for 48 h. Control cells were processed simultaneously.

2.3. Cell Counting

At the end of the different culture times, conditions and/or treatments, the medium was removed, cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and 200 μ L of 0.25% trypsin/EDTA solution was added to detach the cells, which were counted immediately in a hemocytometer.

2.4. Ecto-5'-NT/CD73 assay

The ecto-5'-NT/CD73 activity was assayed, as described by Wink et al. [27]. After different culture times, conditions and/or treatments, the 24 multi-well plates containing glioma cells were washed three times with incubation medium. The reaction was started by the addition of 200 μ L of incubation medium containing 2mM MgCl₂, 120mM NaCl, 5mM KCl, 10mM glucose, 20mM HEPES, pH 7.4 and 2mM of AMP at 37°C. After 10 min of incubation, the reaction was stopped by taking an aliquot of the incubation medium, which was transferred to eppendorf

tubes containing trichloroacetic acid (5% final concentration, w/v) previously placed on ice. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the malachite green method [28], using KH_2PO_4 as a Pi standard. The non-enzymatic Pi released from the nucleotide into the assay medium without cells was subtracted from the total Pi released during the incubation, giving net values for enzymatic activity. Specific activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.5. Protein determination

Cells in the 24-well microplates were solubilized with 100 μL NaOH (1.0 M) and frozen overnight. An aliquot was collected and protein was measured by the Coomassie blue method [29] using bovine serum albumin as standard. The protein determinations were carried out in all experiments.

2.6. RT-PCR analysis

Total RNA of the human U138-MG glioma cell line was isolated with Trizol LS reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, California, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA species were synthesised with Reverse Transcriptase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) from 5 μg total RNA in a final volume of 25 μl with a random hexamer primer, in accordance with the manufacturer's instructions. cDNA reactions were performed for 1h at 37°C and stopped by cooling at 4°C. Three microliters of cDNA were used as a template for PCR in a total volume of 20 μl using a concentration of 0.5 μM of each primer

(specific for ecto-5'-NT/CD73 or GAPDH) indicated below, 50 μ M of dNTP and 1 U Taq polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in the supplied reaction buffer. As a control for cDNA synthesis, RT-PCR for GAPDH was performed. The PCR cycling conditions were as follows: 1min at 95°C, 1min at 94°C, 1min at annealing temperature (52°C for both primers), 1min at 72°C. All PCRs were carried out for 35 cycles and included a final 10min extension at 72°C. Ten microliters of the PCR reaction were analysed on a 1.5 % agarose gel containing ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. Bands were quantified using the Image J program. The following sets of primers were used: for ecto- 5'-NT/CD73: 5'GAT CGA GCC ACT CCT CAA A 3' and 5'GCC CAT CAT CAG AAG TGA C3' (amplification product: 437 bp) and for GAPDH: 5'CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC3' and 5'CCA TGG AGA AGG CTG GGG 3' (amplification product: 195 bp). Negative controls were performed with templates substituted by DNase/RNase free distilled water for each PCR reaction. Ecto-5'-NT/CD73 mRNA expression was determined as the ratio of the ecto-5'-NT/CD73 to GAPDH band density.

2.7. Flow cytometry analysis

For flow cytometry analysis, U138-MG glioma cells were grown at different confluences. After that, the medium was removed and the cells were trypsinized. Dissociated cells were counted immediately in a hemocytometer and 1×10^6 cells were centrifuged and washed with PBS. The pellets were resuspended and the cell suspension was incubated for 1h with mouse anti-human CD73 antibody (IgG₁, phycoerythrin [PE]) (1:10) for 1h at 4°C. In parallel, the same number of

cells was performed without antibodies. Immediately before flow cytometry analysis, labelled cells were mixed with the non-labelled cells. 50 000 events in the cell gate were collected with a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA) using CellQuest software (BD Biosciences). Results were analyzed using Winndi and Cychred software (University of Wales College of Medicine, Cardiff, UK) and were shown as the ratio of labelled cells: non-labelled cells.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD and analyzed for statistical significance by one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc or Student's T test. Differences between mean values were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Cell density influence on ecto-5'-NT/CD73 activity

To investigate whether cell density could affect ecto-5'-NT/CD73 activity, C6 and U138-MG glioma cells at different confluences (approximately 20, 40, 60, 80, 90 and 100% confluence) were incubated with AMP as substrate and the enzymatic activity was determined under the conditions described in Materials and Methods. As shown in Figure 1, increasing confluence leads to an increase in ecto-5'-NT/CD73 specific activity in both C6 and U138-MG glioma cell lines. A significant increase of 65% ($P < 0.05$), 93% ($P < 0.001$) and 117% ($P < 0.001$) was

observed in AMP hydrolysis for confluences of 80%, 90% and 100% of C6 glioma cells, respectively, when compared with 20% confluence (Figure 1A). For the U138-MG glioma cell line, significant increases in AMP hydrolysis of 99% ($P<0.05$), 120% ($P<0.001$), 155% ($P<0.001$) and 175% ($P<0.001$) were observed for 60% 80%, 90% and 100% of confluence respectively, when compared with 20% confluence (Figure 1B). The absolute cell numbers were: $49,500 \pm 3,400$; $98,600 \pm 5,300$; $153,000 \pm 5,800$; $206,000 \pm 6,200$; $253,000 \pm 7,800$ and $310,000 \pm 8,000$ cells for rat C6 glioma cell line (Figure 1A) and $38,000 \pm 2,200$; $77,000 \pm 3,100$; $121,000 \pm 3,800$; $164,000 \pm 4,250$; $207,000 \pm 4,560$ and $237,500 \pm 5,700$ cells for human U138-MG glioma cell line for 20%, 40%, 60%, 80%, 90% and 100% cell confluence, respectively (Figure 1B).

3.2 Increase in ecto-5'-NT/CD73 activity with increasing number of days of culture

The cells were seeded at the same densities and allowed to grow for 1, 3 or 5 days (C6 cells) and for 2, 4 or 6 days (U138-MG) to obtain sub-confluence (nearly 50% of growth), semi-confluence (nearly 80% of growth) and confluence (100% of growth) cell levels, respectively. The cultures were then incubated with AMP as substrate and the enzymatic activity was determined under the conditions described in Materials and Methods. The results showed an increase in ecto-5'-NT/CD73 specific activity of 64% ($P<0.01$) after 2 days of culture (semi-confluent cultures) and 114% ($P<0.001$) after 3 days of cultures (confluent cultures) for C6 glioma cells when compared with sub-confluent cultures (1day of culture) (Figure 2A). Figure 2B shows a significant increase of 60% ($P<0.001$) in ecto-5'-NT/CD73 activity after 6 days of culture (confluent cells), when compared with 2 days (sub-

confluent cells) for the U138-MG glioma cell line. The absolute cell numbers were: 94,200 \pm 4,600; 201,300 \pm 5,200 and 338,000 \pm 7,500 cells for rat C6 glioma cell line (Figure 2A) and 72,000 \pm 4,100; 153,400 \pm 5,700 and 229,900 \pm 6,250 cells for human U138-MG glioma cell line (Figure 2B).

3.3 Increase in ecto-5'-NT/CD73 mRNA levels in increasingly confluent U138-MG glioma cells

Since increasing confluences promoted a significant increase in AMP hydrolysis, the mRNA levels of ecto-5'-NT/CD73 were measured in human U138-MG glioma cells in order to verify whether this increase was a result of an enhanced expression of the ecto-5'-NT/CD73 mRNA. U138-MG glioma cells revealed a specific signal (437 bp fragment) corresponding to ecto-5'-NT/CD73 mRNA. Figure 3 shows that there was a significant increase in the expression of the ecto-5'-NT/CD73 mRNA for U138-MG, when cells at confluence were compared to sub- or semi-confluent cells. The increase of 1.7 fold ($P < 0.05$) in the ratio of the ecto-5'-NT/CD73 to GAPDH band density is shown in Figure 3B. This result indicates that the increase in ecto-5'-NT/CD73 activity observed in Figure 2 is related to an overexpression of the ecto-5'-NT/CD73 mRNA, suggesting an increase in protein levels.

3.4 Increase in ecto-5'-NT/CD73 protein expression in increasingly confluent glioma cells

To investigate whether the increase in ecto-5'-NT/CD73 was the consequence of an increase in protein expression on the cell surface, flow cytometry was performed. A significant increase of 112% ($P < 0.05$) was observed in the expression of ecto-5'-NT/CD73 protein in U138-MG glioma cells, when comparing confluent cultures with sub-confluent cultures (Figure 4). This result confirms that the increase in mRNA is accompanied by an increase in protein expression.

3.5 Effect of APCP, adenosine and AMP on human U138-MG glioma cells

To better investigate the involvement of ecto-5'-NT/CD73 in glioma cell proliferation, the cells were treated with $1\mu\text{M}$ APCP (α,β -methylene ADP), an ecto-5'NT/CD73 inhibitor, for 48h and the cell proliferation was evaluated by cell counting. The AMP hydrolysis was inhibited by 24% (data not shown) in the presence of this inhibitor and the treatment with APCP caused a parallel and significant reduction of 20% ($P < 0.05$) in U138-MG glioma cell proliferation (Figure 5A). These results support those of the literature and indicate the participation of the enzymatic activity of ecto-5'-NT/CD73, in addition to its function as an adhesion protein in the cell proliferation of glioma cells. To investigate whether the effect caused by ecto-5'-NT inhibition was due to AMP (that can be accumulated) or adenosine (that can be reduced), the effect of AMP and adenosine was tested on glioma cell proliferation. Confirming the previous results of our group [25], adenosine induced glioma cell proliferation significantly by 25% ($P < 0.05$) (Figure 5B). In addition, AMP in concentrations of 1mM and 3mM decreased U138-MG

glioma cell proliferation by 29% ($P < 0.05$) and 42% ($P < 0.01$), respectively, indicating a possible cytotoxic effect of this nucleotide for these cells.

4. Discussion

Gliomas are a large collection of primary brain tumors that have similar morphology and gene expressions to those of glia and their precursors. Glioblastoma multiforme, the most aggressive type of glioma, is associated with very poor survival, as such glioma epidemiology has focused on identifying factors that can be modified to prevent this disease [1].

Ecto-5'-NT/CD73 is a membrane bound glycoprotein, which hydrolyses extracellular nucleotides into bioactive nucleoside intermediates [11]. Ecto-5'-NT/CD73 seems to have functions that are not related to its catalytic activity, being involved in adhesion, in promoting tumor invasiveness, in CNS regeneration and repair, in development and in cancer [16, 30, 31]. Adenosine, a product of ecto-5'-NT/CD73 enzyme activity, has an important role in many physiological and pathological events including tumorigenesis regulation [32]. One characteristic of adenosine is to differentially modulate normal and transformed cell growth, depending on its extracellular concentration, the expression of adenosine cell surface receptors, and the physiological state of the target cell [33].

Accumulating evidence suggests that purinergic signaling is involved in the growth and progression of glioma cells. We previously demonstrated that glioma cells present an almost undetectable ATP- and ADP-hydrolysis activity, while they have a significantly higher AMP-degrading activity when compared to normal astrocytes [27]. ATP and adenosine are recognized as mitogenic factors that

induce proliferation in human glioma cells [25] and the substantial decrease in ATP and ADP hydrolysis with a high ecto-5'-NT/CD73 activity may represent an important mechanism associated with malignant transformation of glioma cell lines [27, 34].

In the present study, we demonstrate that increasing confluences and culture times lead to increases in the specific activity of ecto-5'-NT/CD73 in both C6 and U138-MG glioma cell lines. In addition, a significant increase in ecto-5'-NT/CD73 mRNA and protein levels, respectively, was observed when comparing confluent cultures with sub-confluent ones. The literature suggests the participation of ecto-5'-NT/CD73 in cell survival and reports that the activity of ecto-5'-NT/CD73 is variable in malignant cells. The elevated enzymatic activity of ecto-5'-NT/CD73 was found in breast carcinoma, gastric cancer, melanoma and glioblastoma [20]. Considering the biological aggressiveness and the invasive potential of glioma cell lines used in present study, our results are in accordance with data from the literature that correlate the level of ecto-5'-NT/CD73 activity with tumor grade.

Considering that the ecto-5'-NT/CD73 enzyme is reported as a protein potentially involved in cell proliferation and tumor progression [30, 17], we tested an ecto-5'-NT/CD73 inhibitor (APCP) to evaluate the role of this enzyme in proliferation of the human U138-MG glioma cell line. When the cells were treated with APCP, a significant reduction in glioma cell proliferation was observed, confirming the involvement of this enzyme in cell proliferation. A plausible explanation for this result is that the inhibition of ecto-5'-NT/CD73, shown herein, may result in a decrease in adenosine formation in the extracellular medium, since adenosine demonstrated a proliferative induction in glioma cells. Thus, we

speculate that ecto-5'-NT/CD73 could promote survival, proliferation and invasion in glioma cell lines, at least in part, through its enzymatic ability to generate adenosine. In addition, the main finding of this work was the cytotoxic effect exhibited by AMP on U138-MG glioma cells. Therefore, the inhibition of AMP hydrolysis by APCP could result in a decrease in extracellular adenosine and an increase in AMP levels. Considering that extracellular adenosine triggers a proliferation signal, while extracellular AMP elicits opposite effects, our findings support the proposed biological role of ecto-5'-NT/CD73 activity in glioma growth as well as its function as an adhesive protein. This enzyme could have another important role in controlling the extracellular concentrations of AMP, a toxic molecule to gliomas, while generating adenosine to promote its growth.

In summary, our study found that ecto-5'-NT/CD73 activity, mRNA and protein expression increase during the proliferative process in gliomas, suggesting an important role of this enzyme during brain tumor development, for three reasons: a) as an adhesive factor *per se*; b) for the adenosine generation in the extracellular space, a well known proliferative factor and c) as a scavenger of AMP in the extracellular space, a toxic molecule for these cells. Taken together, these results suggest an important role of ecto-5'-NT/CD73 in glioma cell proliferation.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

1. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M (2006) Epidemiology and molecular pathology of gliomas. *Nature* 2 (9): 494-501.
2. Dai C, Holland EC. Glioma models (2001) *Biochem Biophys Acta* 1551:M19-M27.
3. Holland EC (2001) Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models. *Nature* 2:120-129.
4. Sathornsumetee S, Reardon D, Desjardins A, Quinn J, Vredenburgh JJ, Rich JN (2007) Molecularly targeted therapy for malignant gliomas. *Cancer* 110(1):13-24.
5. Avgeropoulos NG, Batchelor TT (1976) New strategies for malignant gliomas. *The Oncologist* 4: 209-224.
6. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(3):215-25.
7. Aaronson SA (1991) Growth factors and cancer. *Science* 254: 1146-1153.
8. Brendel M, Pollack IF (1999) The p21-Ras signal transduction pathway and growth regulation in human high-grade gliomas. *Brain Res Reviews* 29: 232-259.
9. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004) Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23: 7267-7273.
10. Kondo T (2006) Brain cancer stem-like cells. *Eur J cancer* 42: 1237-1242.

11. Zimmermann H (1992) 5'-Nucleotidase: Molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285 (Pt 2): 345-365.
12. Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GW (1984) Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J Neurochem* 43(4):971-978.
13. Turnay J, Olmo N, Rissi G, Von der Mark K, Lizarbe MA (1989) *In Vitro Cell Dev Biol* 25(11) 1055-1061.
14. Navarro JM, Olmo N, Turnay J, López-Conejo MT, Lizarbe MA (1998) Ecto-5'-nucleotidase from a human colom adenocarcinoma cell line. Correlation between enzyme activity and levels in intact cells. *Mol Cell Biochem* 187:131-131.
15. Vogel M, Kowalewski HJ, Zimmermann H, Janetzko A, Margolis RU, Wollny HE (1991) Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata*. *Biochem J* 278:199-202.
16. Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Purune, Smith D J, Jalkanen S (1995) CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med* 182: 1603-1608.
17. Sadej R, Spychala J, Skladanowski C (2006) Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Res* 16:213-222.
18. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, Zhou P (2007) Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. DOI 10.1007/s00432-007-0292-z.
19. Ujházy P, Berleth ES, Pietkiewicz JM, Kitano H, Skaar JR, Ehrke MJ, Mihich E (1996) Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance. *Int J Cancer* 68: 493-500.

20. Spychala J (2000) Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 87:161-173.
21. Eroglu A, Cambolat O, Demirci S, Kocaoglu H, Eryavuz Y, Akgul H (1997) Activities of adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in cancerous and noncancerous human colorectal tissues. *Med Oncol* 17: 319-324.
22. Jacobson K A, Hoffmann C, Cattabeni F, Abbracchio M P (1999) Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling. *Apoptosis* 4: 197-211.
23. Resta R, Thompson LF (1997) T cell signalling through CD73. *Cell Signal* 9:131-139.
24. Merighi S, Mirandola P, Varani K, Gessi S, Leung E, Baraldi PG, Tabrizi MA, Borea PA (2003) A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther* 100: 31-48.
25. 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 Neuro-oncol* 64, 211–218.
26. Merighi, S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz KN, Leung,E, Baraldi PG, Borea PA (2002) Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 119:923-933.
27. Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Schwartzmann G, Sarkis JJF, Battastini AMO (2003) Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett* 198, 211-218.
28. Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺ stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157: 375-380.

29. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
30. Fenoglio C, Necchi D, Civallero M, Ceroni M, Nano R (1997) Cytochemical demonstration of nitric oxide synthase and 5'-nucleotidase in human glioblastoma. *Anticancer Res* 17:2507–2511.
31. Ludwig H C, Rausch S, Schallock K, Markakis E (1999) Expression of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. *Anticancer Res* 19(3A): 1747-1752.
32. Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. *Drug Develop Res* 52: 44-56.
33. Ohana G, Bar-Yehuda S, Barer F, Fishman P (2001) Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor. *J Cell Physiol* 186: 19-23.
34. Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann PW, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MIA, Lenz G, Battastini AMO (2006) Involvement of extracellular ATP on the glioblastoma growth in a rat glioma model. *BMC Cancer* 6: 226-236.

Legends

Figure 1: Cell density influence on ecto-5'-NT/CD73 activity. C6 (A) and U138-MG (B) glioma cells were seeded at different densities and allowed to reach approximately 20, 40, 60, 80, 90 and 100% confluence. Cells were incubated with 2mM AMP for 10 minutes. The absolute cell count was performed as described in the text. Specific activity values are expressed as nmol Pi/min/mg protein. The values represent means \pm SD from three independent experiments. The effect was statistically different in relation to the control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, as determined by one-way ANOVA followed by the Tukey test.

Figure 2: Increase in ecto-5'-NT/CD73 activity with increasing number culture days. Different confluences were obtained after seeding 5,000 cells per well for C6 and 10,000 cells per well for U138-MG glioma. Following culture times of (A) 1, 3 or 5 days for C6 and (B) 2, 4 or 6 days for U138-MG, cells were incubated with 2mM AMP for 10 minutes. Specific activity values are expressed as nmol Pi/min/mg protein. The values represent means \pm SD from three independent experiments. The effect was statistically different in relation to the first day of incubation at ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ as determined by one-way ANOVA followed by Tukey test.

Figure 3: Ecto-5'-NT/CD73 expression in U138-MG glioma cells evaluated by semi-quantitative RT-PCR after different cell confluences. After the cultures reached different confluences: sub-confluence (50% of growth), semi-confluence (80% of growth) or confluence (100% of growth), total RNA was extracted and

processed for analysis of ecto-5'-NT/CD73 expression in U138-MG glioma cell line. The PCR products were separated on a 1.5% agarose gel (A) and the expression was evaluated by determining the CD73 to GAPDH mRNA ratio (B). The effect was statistically different in relation to the first confluence at * $p < 0.05$ as determined by one-way ANOVA followed by Tukey test. Values are representative of 3 independent experiments.

Figure 4: Flow cytometry analysis of ecto-5'-NT/CD73 protein expression in U138-MG glioma cells at different confluences. After growth to sub-confluence (50% of growth), semi-confluence (80% of growth) or confluence (100% of growth), U138-MG glioma cells were trypsinized and prepared as described in Materials and methods. After 1h of incubation with mouse anti-human CD73 antibody (IgG₁, phycoerythrin [PE]) (1:10), the mixture of cells (cells labelled with antibody and non-labelled cells) were collected and analysed with a FACS flow cytometer. Results are shown as the ratio of labelled cells / non-labelled cells. Values represent means \pm SD of three independent experiments. This effect was statistically significant in relation to the control at * $P < 0.05$, as determined by one-way ANOVA followed by Tukey test.

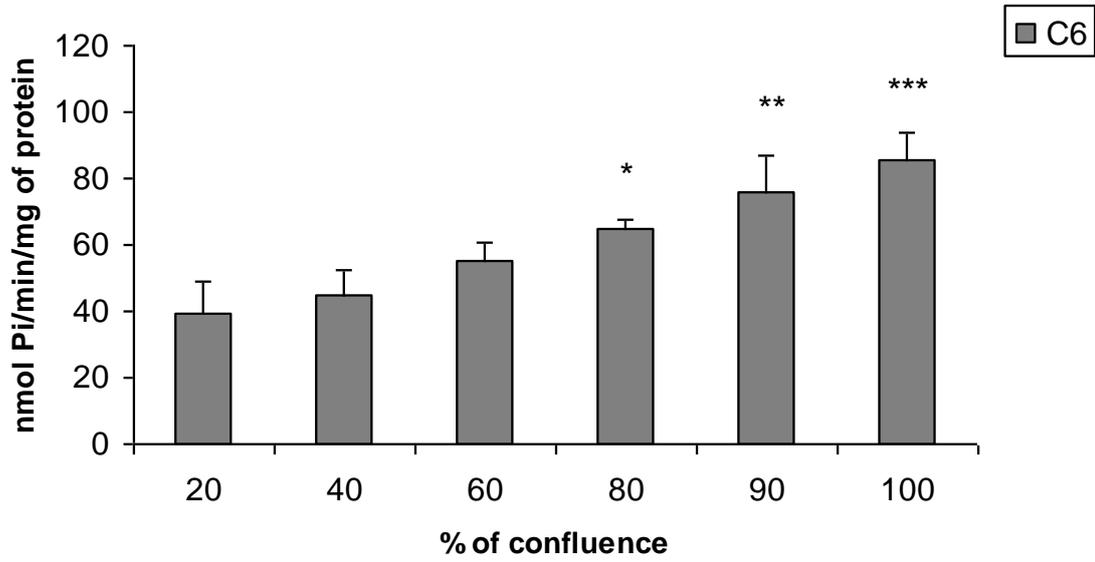
Figure 5: Effect of APCP, adenosine and AMP on U138-MG cell proliferation. Semi-confluent cells were treated with (A) 1 μ M APCP, (B) 100 μ M adenosine or (C) AMP (50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1mM or 3mM) for 48h. Following incubation, cells were detached with 0.25% trypsin-EDTA and counted in a hemocytometer. Data are the means \pm SD of three independent experiments. The control was

considered as 100 %. The effect was statistically different in relation to control at $*p < 0.05$ or $*p < 0.01$ as determined by Student's T test in figures A and B and by one-way ANOVA followed by Tukey test in figure C.

Figures

Figure 1

A



B

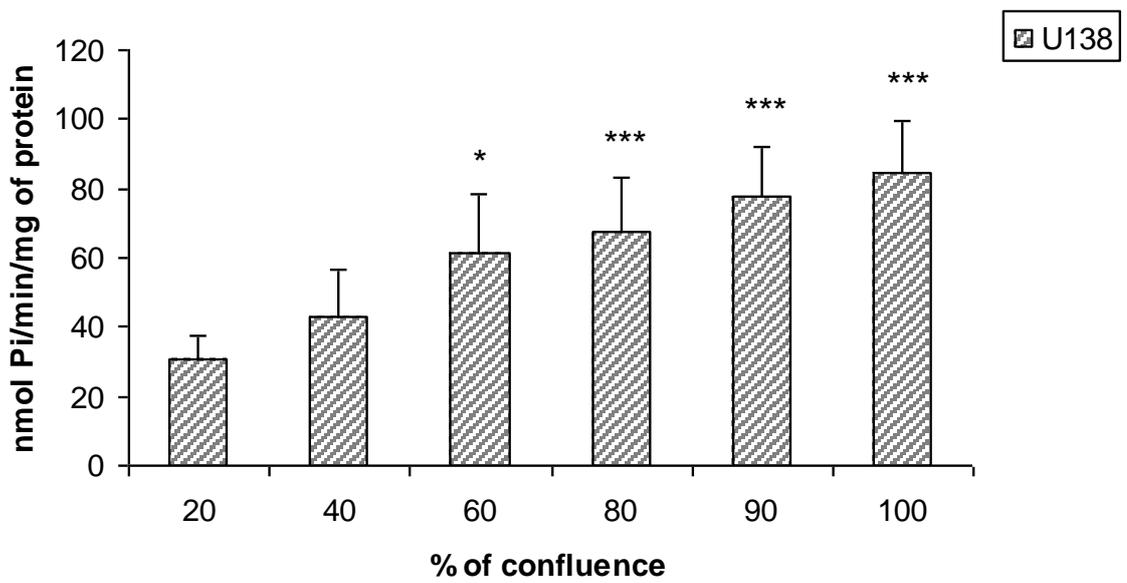
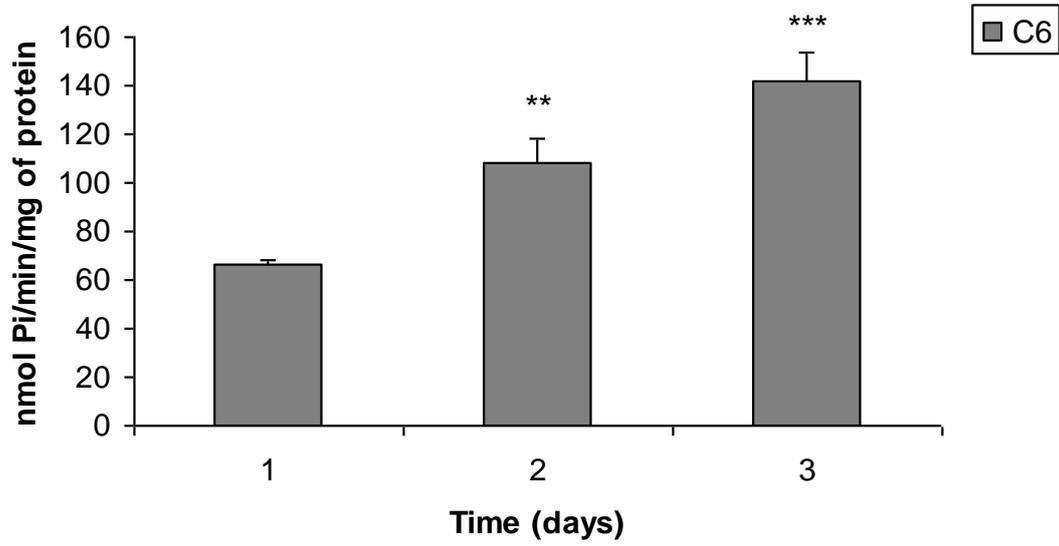


Figure 2

A



B

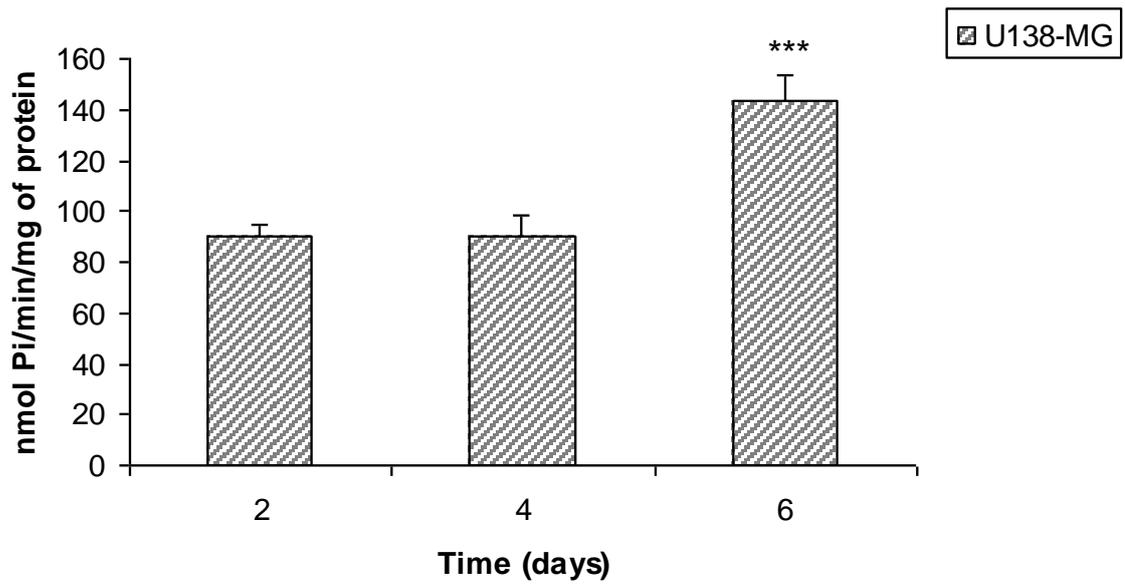
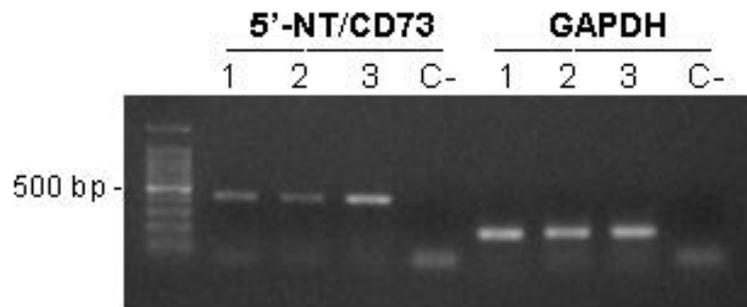


Figure 3

A



B

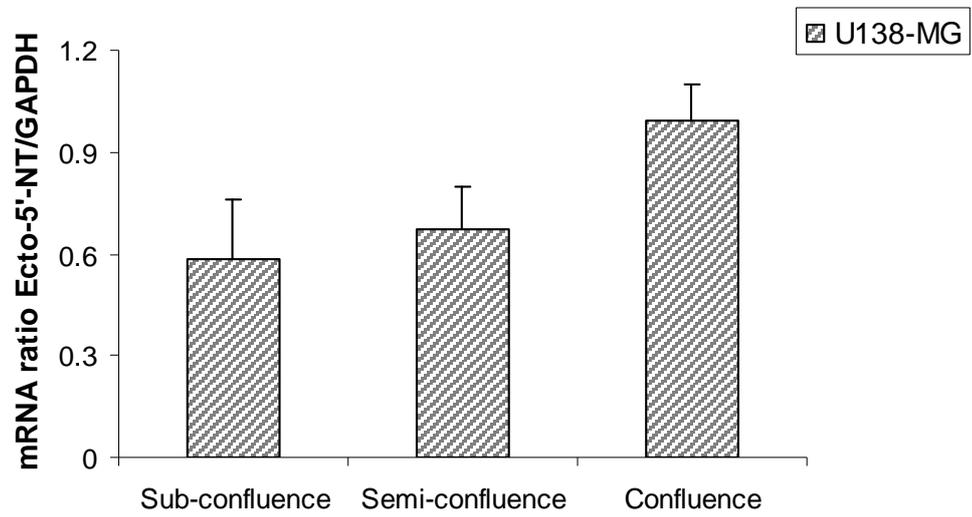


Figure 4

A

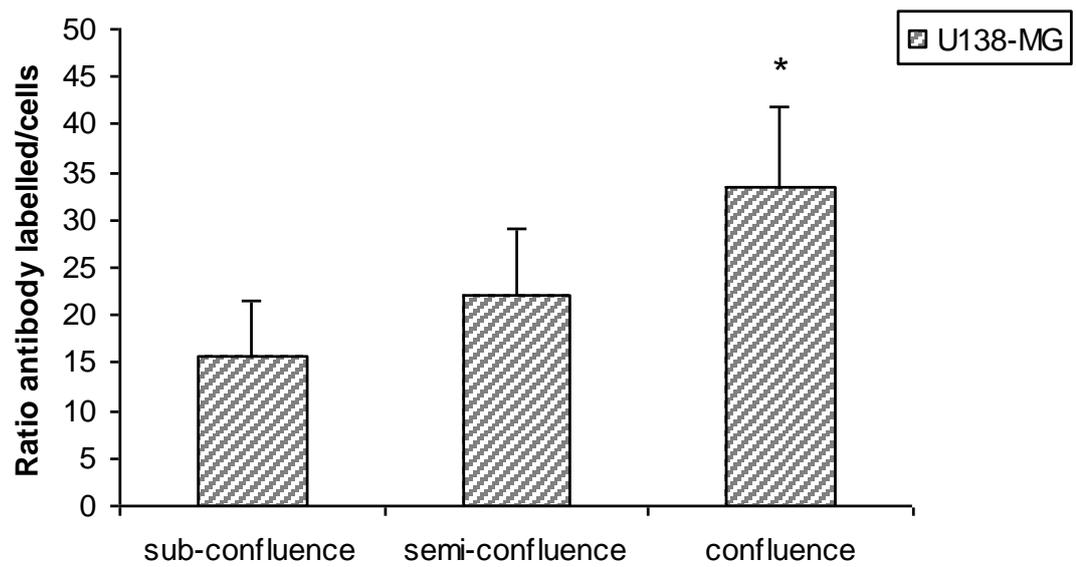
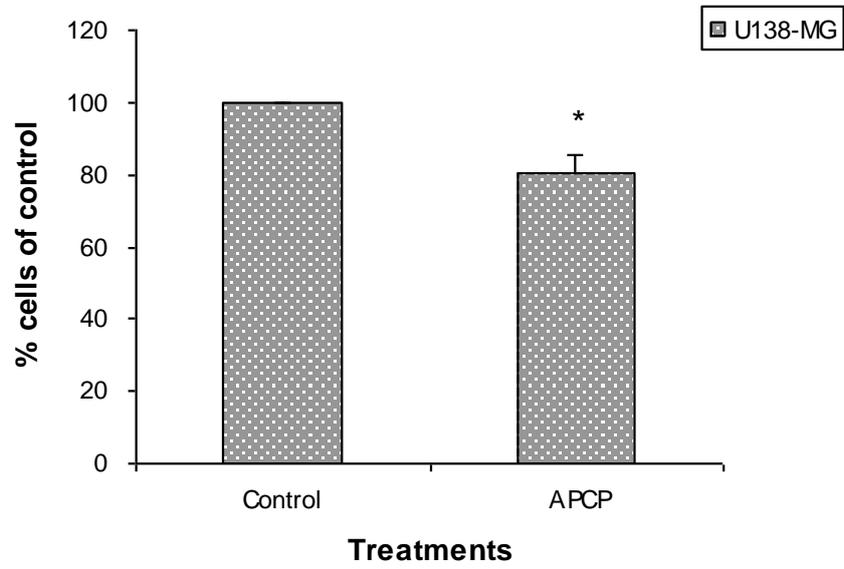
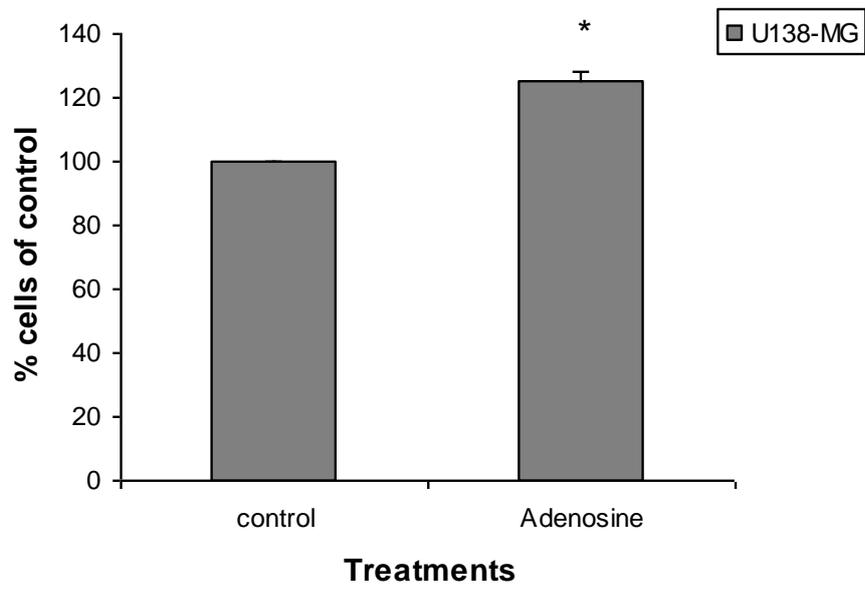


Figure 5

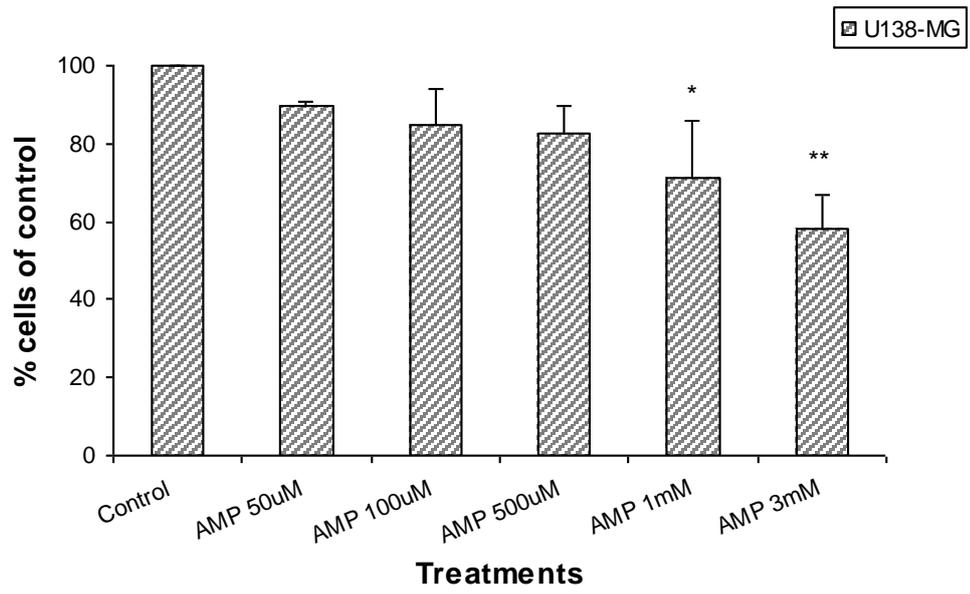
A



B



C



4.2. Capítulo II:

4.2.1. Apresentação dos resultados que não constam no artigo

4.2.2.1. Caracterização das células C6 e U138-MG após o processo de silenciamento estável da ecto-5'-NT/CD73 pela técnica do RNAi.

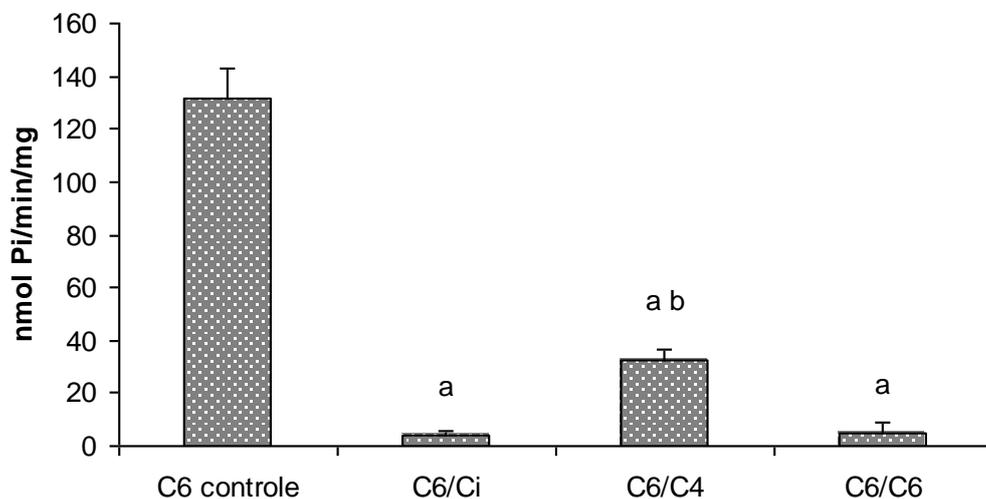


Figura 1: Atividade da ecto-5'-NT/CD73 após silenciamento pela técnica do RNA de interferência em linhagem de glioma C6 de rato. Após o processo de silenciamento as células C6 controle, C6/Ci (controle da transdução), C6/C4 e C6/C6 com ecto-5'-NT/CD73 silenciada foram semeadas e crescidas até a confluência. As culturas foram incubadas AMP 2,0 mM por 10 min, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam média \pm desvio padrão e foram analisados através do teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,001$).

^a estatisticamente diferente do grupo controle normal. ^b estatisticamente diferente do grupo controle ci.

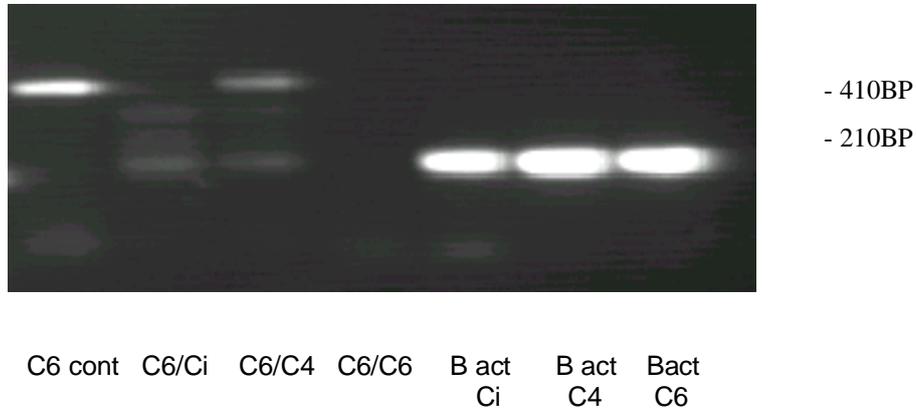


Figura 2: Expressão da ecto-5'-NT/CD73 após seu silenciamento pela técnica do RNA de interferência em linhagem de glioma C6 de rato avaliada por RT-PCR semi-quantitativo. Após atingirem a confluência, o mRNA das células C6 controle, C6/Ci (controle da transdução), C6/C4 e C6/C6 com ecto-5'-NT/CD73 silenciada foi extraído para análise da expressão da ecto-5'-NT/CD73. Os produtos do PCR foram separados em gel de agarose 1,5%.

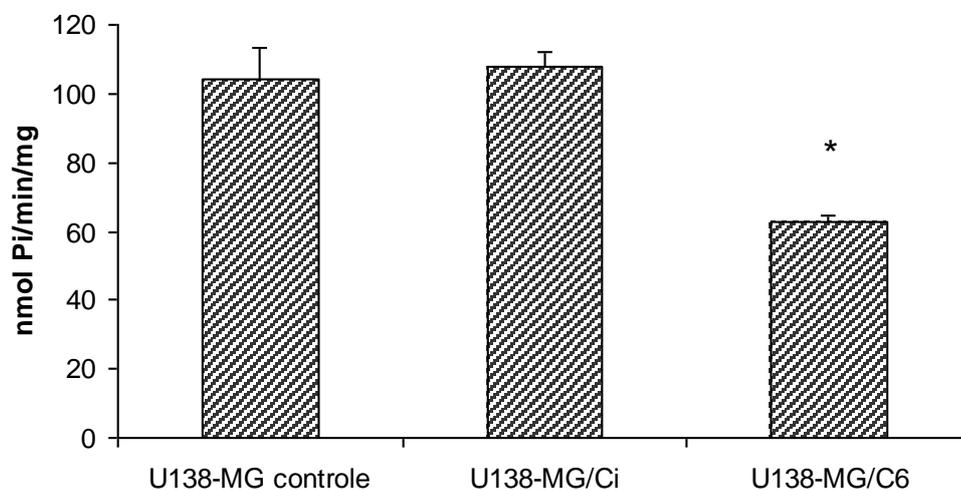


Figura 3: Atividade da ecto-5'-NT/CD73 após silenciamento pela técnica do RNA de interferência em linhagem de glioma humano U138-MG. Após o processo de silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 as células U138-MG controle, U138-MG/Ci (controle da transdução) e U138-MG/C6 foram semeadas e crescidas até a confluência. Em seguida, as culturas foram incubadas AMP 2,0 mM por 10 min, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam média \pm desvio padrão e foram analisados através do teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$.

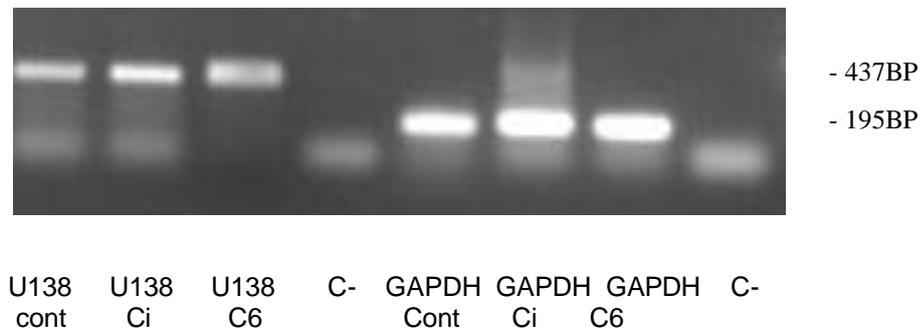


Figura 4: Expressão da ecto-5'-NT/CD73 após seu silenciamento pela técnica do RNA de interferência em linhagem de glioma humano U138-MG avaliada por RT-PCR semi-quantitativo. Após atingirem a confluência, o mRNA das células U138-MG controle, U138-MG/Ci (controle da transdução) e U138-MG/C6 com ecto-5'-NT/CD73 silenciada foi extraído para análise da expressão da ecto-5'-NT/CD73. Os produtos do PCR foram separados em gel de agarose 1,5%.

4.2.2.2. Efeito do silenciamento da expressão da ecto-5'-NT/CD73 sobre a migração celular em linhagem de glioma humano U138-MG

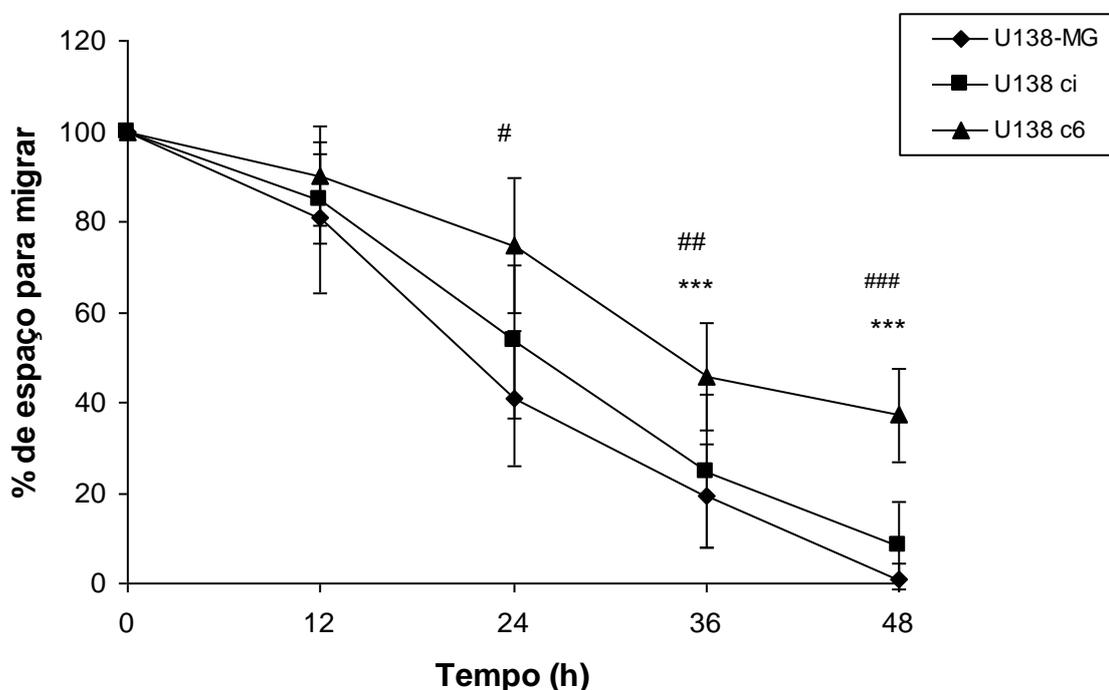


Figura 5: Silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 diminui a migração celular em linhagem de glioma humano U138-MG. As células U138-MG controle, U138-MG/Ci (controle da transdução) e U138-MG/C6 com ecto-5'-NT/CD73 silenciada foram semeadas em placas de 12 poços e crescidas até a confluência. Após, com o auxílio de uma ponteira foi feita uma fenda na monocamada de células, gerando a separação das mesmas. A migração celular foi observada e fotografada ao microscópio durante 48 h e o espaço migrado foi quantificado. Os dados representam % de espaço que as células apresentam para migrar \pm desvio padrão e foram analisados através do teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

* estatisticamente diferente da U138-MG controle. # estatisticamente diferente da U138-MG/Ci.

5. DISCUSSÃO

Os gliomas representam o tipo mais comum e devastador de tumor primário do SNC. O termo glioma envolve uma grande variedade de tumores cerebrais, os quais apresentam morfologia e expressão gênica semelhantes à glia e/ou a seus precursores (Holland, 2001). Os gliomas consistem numa população heterogênea de células contendo uma maioria de células mutadas tumorais e uma minoria de células tronco tumorigênicas, provavelmente responsáveis pela rápida propagação desses tumores (Zheng *et al.*, 2007). As linhagens de glioma de rato C6 e U138-MG de humano foram utilizadas neste trabalho como modelos de glioblastoma multiforme (GBM), o qual representa o tipo mais agressivo de glioma e está associado com baixo tempo de sobrevida dos pacientes. Muitos estudos tentam identificar fatores que podem estar envolvidos na origem e progressão desta patologia, bem como novas estratégias de tratamento, a fim de aumentar a taxa de sobrevida média dos pacientes, a qual permanece inalterada há muitos anos, ficando em torno de 9- 12 meses (Schwartzbaum *et al.*, 2006). Embora o GBM apresente comportamento bastante agressivo no cérebro, metástases fora do SNC são muito raras. Isto se deve a várias razões como morte precoce do pacientes antes da detecção de possíveis metástases; impedimento do crescimento fora ao SNC devido ao ataque imunológico ou pela ausência dos fatores tróficos e composição da matriz extracelular (MEC) dos vasos sanguíneos que ajuda a prevenir o acesso do GBM para o meio intravascular, bloqueando a disseminação imunológica (Mourad *et al.*, 2005).

A ecto-5'-NT/CD73, uma glicoproteína ligada à membrana plasmática apresentando seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, é a enzima

responsável principalmente pela hidrólise do AMP até adenosina (Zimmermann, 1992). A adenosina apresenta um importante papel em muitos eventos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo a regulação da tumorigênese (Zimmermann, 2001), apresentando diferentes ações como estímulo proliferativo e até sinalização de morte celular, dependendo da expressão e da ligação aos seus receptores específicos do tipo P1, além das concentrações da mesma no meio extracelular (Ohana *et al.*, 2001). Além da importante atividade enzimática, a ecto-5'-NT/CD73 apresenta papel importante como proteína de adesão, sendo bem conhecida com tal em linfócitos (Airas *et al.*, 1995) e servindo como molécula promotora da invasividade tumoral em glioblastomas humanos (Fenoglio *et al.*, 1997). A ecto-5'-NT/CD73 também é considerada um fator de motilidade e é descrita como envolvida na regeneração e reparo de danos no SNC e no desenvolvimento de câncer. Estes dados previamente publicados indicam um importante papel da ecto-5'-como molécula de adesão celular em muitos sistemas biológicos, evidenciando várias funções além da sua atividade catalítica (Fenoglio *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2007).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa têm demonstrado fortes evidências de que a sinalização purinérgica está envolvida no crescimento e na progressão dos gliomas. Inicialmente, foi demonstrado que gliomas apresentam alterações no metabolismo extracelular dos nucleotídeos da adenina, exibindo uma baixa atividade ATPásica e uma elevada atividade AMPásica, comportamento oposto ao dos astrócitos (Wink *et al.*, 2003). Além disso, ATP e adenosina no meio extracelular induzem estímulo proliferativo em diferentes culturas de gliomas (Morrone *et al.*, 2003) e ao contrário do tecido cerebral normal, gliomas apresentam uma clara resistência à morte induzida por

concentrações citotóxicas de ATP (Morrone *et al.*, 2005). Finalmente, a co-injeção de apirase, enzima envolvida na hidrólise do ATP e do ADP, resultou numa redução das características tumorais malignas em modelo animal de gliomas *in vivo* (Morrone *et al.*, 2006). Pela constatação da alta atividade AMPásica em gliomas e considerando que a ecto-5'-NT/CD73 pode estar envolvida em eventos de migração e adesão celular, (Dieckhoff *et al.*, 1986) e no acúmulo de adenosina, molécula que potencialmente pode contribuir para a progressão tumoral (Spychala, 2000), neste trabalho nós estudamos o envolvimento e as funções da ecto-5'-NT/CD73 durante a proliferação de linhagens de gliomas em cultura.

Primeiramente, foi investigado o envolvimento da ecto-5'-NT/CD73 no processo proliferativo das linhagens de gliomas C6 e U138-MG. Os resultados apresentados no Capítulo 1 desta dissertação revelam que crescentes confluências celulares, obtidas tanto por aumento da densidade celular quanto pelos crescentes dias de cultivo, ocasionaram um aumento da atividade enzimática específica da ecto-5'-NT/CD73 em ambas linhagens de gliomas estudadas (Figuras 1 e 2). Interessantemente, o aumento da atividade enzimática não foi devido ao aumento do número de células somente, mas provavelmente também ao aumento da expressão da proteína. De fato, um significativo aumento de 1,7 vezes ou 71% ($P < 0.05$) na razão ecto-5'-NT/CD73/GAPDH dos níveis de mRNA e de 112% ($P < 0.05$) nos níveis de expressão da ecto-5'NT como proteína foram observados quando comparadas culturas confluentes com as subconfluentes da linhagem de glioma humano U138-MG (Figuras 3 e 4). Estes resultados estão de acordo com os dados previamente publicados por Turnay, em 1989, para outras linhagens celulares de gliomas, demonstrando que a atividade da ecto-5'-NT/CD73 varia em função da densidade celular, elevando-se com o

aumento da confluência das culturas e sugerindo que esta enzima pode estar envolvida no processo de progressão tumoral dos gliomas.

Em adição, o α - β metileno ADP (APCP 1 μ M), inibidor competitivo da ecto-5'-NT/CD73, foi capaz reduzir significativamente em 20% ($P < 0,05$) a proliferação celular na linhagem de glioma humano U138-MG (Figura 5A), confirmando o envolvimento da atividade enzimática da ecto-5'-NT/CD73 na proliferação dos gliomas. Este efeito do tratamento com APCP está de acordo com os dados da literatura que sugerem um papel *per se* desta enzima na sobrevivência celular (Turnay *et al.*, 1989; Navarro *et al.*, 1998; Zimmermann, 2002). Esta inibição do crescimento celular causada pela inibição da enzima pelo APCP pode ser decorrente da redução da quantidade de adenosina, produto da reação, no meio extracelular, uma vez que esta molécula é um importante fator proliferativo nesta linhagem de glioma. Confirmando esta hipótese e os dados previamente publicados (Morrone *et al.*, 2003), 100 μ M de adenosina aumentou em 25% ($P < 0,05$) a proliferação das células da linhagem U138-MG (Figura 5B). Assim, de forma similar ao previamente descrito para câncer de mama (Wang *et al.*, 2007), foi verificado que a atividade da ecto-5'-NT/CD73 é muito importante durante o processo proliferativo dos gliomas, provavelmente pela geração de adenosina, além do seu papel como molécula de adesão, como também previamente descrito na literatura.

Tanto os dados da literatura, quanto os estudos do nosso laboratório têm focado a atenção no ATP e na adenosina como moléculas sinalizadoras de processos de proliferação e/ou morte celular de gliomas. Entretanto, muito pouco tem sido investigado com relação ao papel do AMP, que é uma molécula intermediária na cascata enzimática de degradação do ATP até adenosina no

meio extracelular. Um dos principais achados do presente trabalho foi o potencial citotóxico apresentado pelo AMP na linhagem humana U138-MG. Este nucleosídeo monofosfatado, principal substrato para a ecto-5'-NT/CD73, nas concentrações de 1 mM e 3 mM foi capaz de reduzir a proliferação celular em 29% ($P < 0,05$) e 42% ($P < 0,01$), respectivamente (Figura 5C), indicando seu efeito tóxico nesta linhagem. Portanto, a função da ecto-5'-NT/CD73 está muito além de simples molécula de adesão, importante em processos de migração, adesão e crescimento celular e da atividade geradora de adenosina para promoção do crescimento celular. No caso dos gliomas, propomos que a atividade aumentada desta enzima represente um mecanismo adicional de “proteção” dessas células tumorais contra um possível efeito tóxico do AMP através da remoção do excesso dessa molécula no meio extracelular, e por conseqüência na manutenção de níveis adequados da mesma. Desta forma, estes resultados nos levam a lançar a seguinte hipótese sobre o papel da ecto-5'-NT/CD73 nos gliomas. As células de glioma, através do seu crescimento levam à lise celular das células adjacentes, gerando extravasamento do conteúdo celular, incluindo altas concentrações de ATP. Este, conforme descrito anteriormente, não apresenta potencial citotóxico para os gliomas, contudo é citotóxico para as células normais do SNC. Desta forma, visando a proteção das células normais do SNC, este nucleotídeo é rapidamente hidrolisado pelas NTPDases, altamente expressas em astrócitos, gerando AMP. Este por sua vez é pobremente hidrolisado pelas células normais e é tóxico para o glioma, conforme mostrado nesta dissertação. Por esta razão, os gliomas disporiam de uma elevada atividade da ecto-5'-NT/CD73 justamente para hidrolisar este nucleosídeo monofosfatado prejudicial à proliferação celular tumoral. Portanto, a ecto-5'-NT/CD73 depleta o AMP citotóxico e gera adenosina,

tanto, foi realizado o silenciamento da ecto-5'-NT/CD73, conforme descrito no material e métodos pela técnica do RNA de interferência (RNAi) e procedida a caracterização das linhagens geradas, tanto para C6 quanto para U138-MG. A técnica conhecida como RNA de interferência consistiu na desativação seletiva do gene da ecto-5'-NT/CD73 através da degradação de seu RNA mensageiro. O RNA de interferência é uma molécula de fita dupla que apresenta complementaridade às bases do mRNA da ecto-5'-NT/CD73, o qual foi inserido nas células de glioma por transdução viral. Após a inserção, as fitas se separam e uma delas se acopla à fita única do mRNA correspondente. Tal acoplamento ativa um complexo protéico conhecido como RISC (complexo silenciador induzido por RNA), que então reconhece aquele mRNA como alvo e passa a degradá-lo, utilizando enzimas denominadas nucleases (presentes no complexo). Isto impede que o mRNA seja lido pelos ribossomos, onde são sintetizadas as proteínas, e desta forma o gene da ecto-5'-NT/CD73 foi silenciado.

Os resultados apresentados no capítulo 2 desta dissertação demonstram que foram geradas duas linhagens com ecto-5'-NT/CD73 silenciada para as células C6, sendo a C6/C4 com 75% de redução da atividade da ecto-5'-NT/CD73 e a C6/C6 com 96% de redução. Entretanto, o controle do processo de transdução viral C6/Ci também apresentou redução de 97% da atividade da ecto-5'-NT/CD73 (Figura 1). De acordo, isto também pode ser evidenciado através do resultado de RT-PCR (Figura 2), onde não foi observada expressão da ecto-5'-NT/CD73 na linhagens C6/Ci e C6/C6, os quais apresentaram silenciamento quase completo, e observada a banda da ecto-5'-NT/CD73 na linhagem C6/C4 que apresentou um menor silenciamento da enzima (Figura 2). Assim, para realização de experimentos futuros é necessário gerar o clone controle sem o

silenciamento da enzima em estudo (trabalho que está em andamento). Para a linhagem U138-MG foi obtido a linhagem controle U138-MG/Ci sem o silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 e um clone U138-MG/C6 com redução de 42% da atividade enzimática após o silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 (Figura 3). Quando analisada a expressão da enzima por RT-PCR, não foram observadas alterações na expressão do mRNA. Contudo, para comparação de expressão é necessária a realização de PCR em tempo real, uma vez que o RT-PCR é um método semi-quantitativo. Experimentos estão em andamento para quantificar a expressão após o silenciamento em ambas as linhagens silenciadas.

Como a ecto-5'-NT/CD73 apresenta importante função em vários processos, incluindo a migração celular, nós investigamos o efeito do silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 neste processo utilizando a linhagem U138-MG, visto que para esta temos o controle da transdução sem o silenciamento da ecto-5'-NT/CD73. Assim, conforme resultado mostrado na figura 5 do capítulo 2 houve uma redução significativa na migração celular na linhagem que apresentou ecto-5'-NT/CD73 silenciada (U138-MG/C6), reforçando a importância desta enzima no processo de migração celular em gliomas. Conforme previamente descrito, em linhagens de câncer de mama, a ecto-5'-NT/CD73 é uma das proteínas envolvidas no processo metastático, promovendo a migração, invasão e adesão celular (Wang *et al.*, 2007) e seu silenciamento reduziu as características malignas, o crescimento *in vivo* e os processos de adesão, migração e invasão (Zhou *et al.*, 2007). No presente trabalho com linhagens de gliomas com ecto-5'-NT/CD73 silenciada, até o momento, foi demonstrado a importância da ecto-5'-NT/CD73 na migração celular.

Em resumo, este trabalho demonstrou que a atividade enzimática, os níveis de mRNA e de proteína da ecto-5'-NT/CD73 se elevam com o aumento das confluências celulares sugerindo uma importante função desta enzima no desenvolvimento e progressão tumoral de gliomas. Isto pode ocorrer devido a três razões:

- a) pelo fato da ecto-5'-NT/CD73 ser uma molécula de adesão;
- b) através da geração de adenosina, aumentando a disponibilidade deste fator proliferativo no espaço extracelular;
- c) através da remoção do AMP extracelular que, em excesso, demonstrou ser citotóxico para a linhagem estudada.

Além disso, dados preliminares demonstraram a importância da ecto-5'NT na migração celular, uma vez que o silenciamento da enzima reduziu este processo. Portanto, o conjunto de dados deste trabalho demonstra que, semelhante ao que ocorre em outros tipos de tumores, a ecto-5'-NT/CD73 está envolvida no crescimento, proliferação e migração de células de glioma em cultura, reforçando novamente a importância desta enzima na sobrevivência destes tumores.

6. CONCLUSÕES

- 1) A atividade da ecto-5'NT/CD73, bem como a expressão de seu mRNA e proteína se elevam de acordo com o aumento a confluência celular nas linhagens de glioma estudadas;
- 2) A inibição da ecto-5'-NT/CD73 pelo APCP ocasionou a inibição da proliferação celular na linhagem de glioma humano U138-MG;
- 3) A adenosina exerce efeito indutor de proliferação celular na linhagem de glioma humano U138-MG;
- 4) O AMP demonstrou efeito citotóxico sobre a linhagem de glioma humano U138-MG;
- 5) O silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 reduz a migração celular na linhagem de glioma U138-MG;
- 6) A ecto-5'-NT/CD73 está efetivamente envolvida no processo de sobrevivência e propagação dos gliomas.

7. PERSPECTIVAS

- 1) Aprofundar o estudo sobre a citotoxicidade causada pelo AMP, avaliando possível receptor e vias de sinalização celular envolvidas e o tipo de morte ocasionada;
- 2) Estudar o efeito da adenosina e do AMP sobre os processos de adesão e migração celular;
- 3) Confirmar por PCR em tempo real a redução da expressão da ecto-5'-NT/CD73 nas células com esta enzima silenciada;
- 4) Analisar o efeito do silenciamento da ecto-5'-NT/CD73 sobre os processos de adesão e proliferação celular nas linhagens de glioma;
- 5) Analisar o crescimento do glioma em modelo de implante *in vivo* em cérebro de ratos, utilizando as células com ecto-5'-NT/CD73 silenciada.

8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO

Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Wink MR, Battastini AMO. DEXAMETHASONE INHIBITS PROLIFERATION AND STIMULATES ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 ACTIVITY IN C6 RAT GLIOMA CELL LINE.

Artigo publicado na revista Journal of Neuro-Oncology em 2006.

Bernardi A, Frozza RL, **Bavaresco L**, Jäger E, Salbego C, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AMO. INCREASE OF INDOMETHACIN CYTOTOXICITY BY INDOMETHACIN-LOADING INTO NANOPARTICLES ON GLIOMA CELL LINES: IN VITRO STUDY.

Artigo aceito para publicação na revista European Journal of Pharmacology em 2008 .

Stella J, **Bavaresco L**, Rockenbach L, Farias PF, Braganhol E, Wink MR, Azambuja AA, Barrios CH, Morrone FB, Battastini AMO. CHARACTERIZATION OF ECTO-NUCLEOTIDASES IN RT4 AND HUMAN BLADDER CANCER CELL LINES.

Artigo em fase final de redação.

9. REFERÊNCIAS

AIRAS L., HELLMAN J., SALMI M., BONO P., PUURUNE T., SMITH D.J., JALKANEN S. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J. Exp. Med.* 182: 1603-1608, 1995.

AIRAS L., NIEMELA J., SALMI M., PUURUNEN T., SMITH D. J., JALKANEN S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol- linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol.* 136: 421-431, 1997.

BEHIN A., HOANG-XUAN K., CARPENTIER A.F., DELATTRE J. Primary brain tumors in adults. *Lancet.* 361: 323-331, 2003.

BOGLER O., NAGANE M., GILLIS J., HUANG H.J.S., CAVENEE W.K. Malignant transformation of p53-deficient astrocytes is modulated by environmental cues in vitro. *Cell Growth and Differ.* 10: 73-86, 1999.

BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254, 1976.

BRANDES A.A., PASETTO L.M., VASTOLA F., MONFARDINI S. Temozolomide in patients with high grade gliomas. *Oncology.* 59: 181-186, 2000.

BREDEL M., POLLACK I.F. The role of protein kinase C (PKC) in the evolution and proliferation of malignant gliomas, and the application of PKC inhibition as a novel approach to anti-glioma therapy. *Acta Neuroc.* 139: 1000-1013, 1997.

BRENDEL M., POLLACK I.F. The p21-Ras signal transduction pathway and growth regulation in human high-grade gliomas. *Brain Res. Reviews.* 29: 232-259, 1999.

BURNSTOCK G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem.* 4: 793-803, 2004.

CERUTI S., FRANCESCHI C., BARBIERI D., MALORNI W., CAMURRI A., GIAMMARIOLI A.M., AMBROSINI A., RACAGNI G., CATTABENI F., ABBRACCHIO M.P. Apoptosis induced by 2-chloro-adenosine and 2-chloro-2-deoxy-adenosine in a human astrocitoma cell line: differential mechanisms and possible clinical relevance. *J. Neurosci. Res.* 60: 388-400, 2000.

CHAN K. M., DELFERT D., JUNGER K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ stimulated ATPase activity. *Anal Biochem.* 157: 375-380, 1986.

CICCARELLI R., BALLERINI P., SABATINO G., RATHBONE M.P., D'ONOFRIO M., CACIAGLI F., DI IORIO P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *In. J. Dev. Neurosci.* 19: 395-414, 2001.

DAI C., HOLLAND E. C. Glioma models. *Biochem Biophys Acta.* 1551: M19-M27, 2001.

DEANGELIS L.M. Brain tumors. *N Engl J Med.* 344:114-23, 2001.

DIECKHOFF J., MOLLENHAUER J., KUHL U., NIGGEMEYER B., VON DER MARK K., MANNHERZ H.G. The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin modify the AMPase activity of 5'-nucleotidase from chicken gizzard smooth muscle. *FEBS Lett.* 195: 82-6, 1986.

DOETSCH F., PETREANU L., CAILLE I., GARCIA-VERDUGO J.M., ALVAREZ-BUYLLA A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*. 36:1021-1034, 2002.

FASTBOM L., PAZOS A., PALACIOS J.M. The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neurosci*. 22: 813-26, 1987.

FENOGLIO C., NECCHI D., CIVALLERO M., CERONI M., NANO R. Cytochemical demonstration of nitric oxide synthase and 5' nucleotidase in human glioblastoma. *Anticancer Res*. 17: 2507-2511, 1997.

FOMCHENKO E. I., HOLLAND E. C. Origins of brain tumors-a disease of stem cells? *Nature*. 2: 288-289, 2006.

FREDHOLM B.B., IJZERMAN A.P., JACOBSON K.A., KLOTZ K.N., LINDEN J. International Union of Pharmacology: XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 53: 527- 552, 2001.

GROBBEN B., DE DEYN P. P., SLEGERS H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res*. 310: 257-270, 2002.

HEILBRONN A., MAIENSCHHEIN V., CARSTENSEN K., GANN W., ZIMMERMANN H. Crucial role of 5'-nucleotidase in differentiation and survival of developing neural cells. *NeuroReport*. 7: 257-261, 1995.

HOLLAND E. C. Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models. *Nature*. 2:120-129, 2001.

KLEIHUES P., LOUIS D.N., SCHEITHAUER B.W., RORKE L.B., REIFENBERGER G., BURGER P.C., CAVENEE W.K. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61:215-25, 2002.

KONDO T. Brain cancer stem-like cells. *Eur J cancer.* 42: 1237-1242, 2006.

KONOPKA G., BONNI A. Signaling pathways regulating gliomagenesis. *Curr Mol Med.* 3: 73-84, 2003.

LIN H., BONDY M.L., LANGFORD L.A., HESS K.R., DELCLOS G.L., WU X., CHAN W., PERSHOUSE M.A., YUNG W.K., STECK P.A. Allelic deletion analyses of MMAC/PTEN and DMBT1 loci in gliomas: relationship to prognostic significance. *Clin Cancer Res.* 4: 2447-54, 1998.

LUDWING H.C., RAUSCH S., SCHALLOCK K., MARKAKIS E. *Anticancer Res.* 19: 1747-1752, 1999.

MAHER E. A., FURNARI F. B., BACHOO R. M., ROWITCH D. H., LOUIS D. N., CAVENEE W. K., DEPINHO R. A. Malignant glioma, genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15: 1311-1333, 2001.

MAZERON J.J., KANTOR G. Radiotherapy in stereotactic conditions (radiosurgery) in malignant brain tumors: clinical research. *Cancer Radiother.* 2: 215-217, 1998.

MERIGHI S., MIRANDOLA P., VARINI K., GESSI K., LEUNG E., BARALDI P.G., TABRIZI M.A., BOREA P.A. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther.* 100: 31-48, 2003.

MILLER C. R., PERRY A. Glioblastoma Morphologic and Molecular Genetic Diversity. *Arch Pathol Lab Med.* 131:397-406, 2007.

MORRONE F.B., JACQUES-SILVA M.C., HORN A.P., BERNARDI A., SCHWARATSMANN G., RODNIGHT R., LENZ G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neuro-Oncology* . 64: 211-218, 2003.

MORRONE F.B., HORN A.P., STELLA J., SPILLER F., SARKIS J.J.F., SALBEGO C., LENZ G., BATTASTINI A.M.O. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neuro-oncology.* 71: 135-140, 2005.

MORRONE F.B., OLIVEIRA D.L., GAMERMANN P.W., STELLA J., WOFCHUK S., WINK M.R., MEURER L., EDELWEISS M.I.A., LENZ G., BATTASTINI A.M.O. Involvement of extracellular ATP on the glioblastoma growth in a rat glioma model. *BMC Cancer.* 6: 226-236, 2006.

MOURAD P.D., FARRELL L., STAMPS L. D., CHICOINE M. R., SILBERGELD D. L. Why are systemic glioblastoma metastases rare? Systemic and cerebral growth of mouse glioblastoma. *Surg Neurol.* 63: 511- 519, 2005.

MOUSSEAU M., CHAUVIN C., NISSOU M.F., CHAFFANET N., PLANTAZ D., PASQUIER B., SCHAEERER R., BENABID A. A study of the expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumors. *Eur J Cancer.* 29A: 753-759, 1993.

NAVARRO J.M., OLMO N., TURNAY J., LÓPEZ-CONEJO M.T., LIZARBE M.A. Ecto-5'-nucleotidase from a human colon adenocarcinoma cell line. Correlation between enzyme activity and levels in intact cells. *Mol. Cell Biochem.* 187:131-131, 1998.

NEARY J.T., RATHBONE M.P., CATTABENI F., ABBRACCHIO M.P., BURNSTOCK G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* 19: 13-18, 1996.

NEARY J.T., WHITTEMORE S.R., ZHU Q., NOREMBERG M.D. Synergistic activation of DNA synthesis in astrocytes by fibroblast growth factor and extracellular ATP. *J. Neurochem.* 63: 490-494, 1994.

NORDEN A.D., WEN P.Y. Glioma therapy in adults. *Neurologist.* 12: 279-92, 2006.

OHANA G., BAR-YEHUDA S., BARER F., FISHMAN P. Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor. *J. Cell Physiol.* 186: 19–23, 2001.

PEYOT M.L., GADEAU A.P., DANDRE F., BELLOC I., DUPUCH F., DESGRANGES C. Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A(2b)-purinoceptor. *Circ. Res.* 86: 76-85, 2000.

PLESNER L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158: 141-214, 1995.

RALEVIC V., BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492, 1998.

RATHBONE M.P., MIDDLEMISS P.J., GYSBERS J.W., ANDREW C., HERMAN M.A., REED J.K., CICCARELLI R., DI IORIO P., CACIAGLI F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59: 663-690, 1999.

RATHBONE M.P., MIDDLEMISS P.J., KIM J.K., GYSBERS J.W., DEFORGE S.P., SMITH R.W., HUGHES D.W. Adenosine and nucleotides stimulate proliferation of chick astrocytes and human astrocytoma cells. *Neurosci. Res.* 13: 1-17, 1992.

REYA T., MORRISON S.J., CLARKE M.F., WEISSMAN I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 414:105-11, 2001.

SADEJ R., SPYCHALA J., SKLADANOWSKI C. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of melanoma. *Mel Res.* 16: 213-222, 2006.

SANAI N., ALAVREZ-BUYLLA A., BERGER M.S. Neuronal stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 353:811-22, 2005.

SANO T., LIN H., CHEN X., LANGFORD L.A., KOUL D., BONDY M.L., HESS K.R., MYERS J.N., HONG Y.K., YUNG W.K., STECK P.A. Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res.* 59: 1820-1824, 1999.

SATHORNSUMETEE S., REARDON D., DESJARDINS A., QUINN J., VREDENBURGH J.J., RICH J.N. Molecularly targeted therapy for malignant gliomas. *Cancer.* 110:13-24, 2007.

SCHLEGEL J., PIONTEK G., BUDDE B., NEFF F., KRAUS A. The Akt/protein kinase B-dependent anti-apoptotic pathway and the mitogen-activated protein kinase cascade are alternatively activated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Lett.* 158:103-108, 2000.

SCHOEN S.W., GRAEBER M.B., TÓTH L., KREUTZBERG G.W. Nucleotidase in postnatal ontogeny of rat cerebellum: a marker for migrating nerve cells? *Dev Brain Res.* 39: 125-36, 1988.

SCHWARTZBAUM J. A., FISHER J. L., ALDAPE K. D., WRENSCH M. Epidemiology and molecular pathology of gliomas. *Nature.* 2: 494-501, 2006.

SHOSHAN Y., NISHIYAMA A., CHANG A., MORK S., BARNETT G.H., COWELL J.K., TRAPP B.D., STAUGAITIS S.M. Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas: implications for the histogenesis of brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 10361-10366, 1999.

SINGH S.K., CLARKE I. D., HIDE T., DIRKS P. B. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene.* 23: 7267–7273, 2004.

SPYCHALA J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* 87: 161-73, 2000.

SPYCHALA J., LAZAROWSKI E., OSTAPKOWICZ A., AYSCUE L.H., JIN A., MITCHELL B.S. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10:708-717, 2004.

STUPP R., PICA A., MIRIMANOFF R.O., MICHIELIN O. A practical guide for the management of gliomas. *Bull Cancer.* 94: 817-822, 2007.

TURNAY J., OLMO N., RISSI G., VON DER MARK K., LIZARBE M.A. 5'-Nucleotidase activity in cultured cell lines. Effect of different assay conditions and correlation with cell proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol.* 25: 1055-1061, 1989.

UJHÁZY P., BERLETH E.S., PIETKIEWICZ J.M., KITANO H., SKAAR J.R., EHRKE M.J., MIHICH E. Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance. *Int J Cancer*. 68: 493-500, 1996.

VALSTER A.; TRAN N. L., NAKADA M., BERENS M. E., CHAN A. Y., SYMONS M. Cell migration and invasion assays. *Methods*. 37: 208-215, 2005.

VOGEL M., KOWALEWSKI H.J., ZIMMERMANN H., JANETZKO A., MARGOLIS R.U., WOLLNY H.E. Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata*. *Biochem J*. 278: 199-202, 1991.

WANG L., ZHOU X., ZHOU T., MA D., CHEN S., ZHI X., YIN L., SHAO Z., OU Z., ZHOU P. Ecto-5-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. DOI 10.1007/s00432-007-0292-z, 2007.

WEINBERG R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81: 323-330, 1995.

WINK M.R., LENZ G., BRAGANHOL E., TAMAJUSUKU A.S.K., SCHWARTSMANN G., SARKIS, J.J.F., BATTASTINI A.M.O. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett*. 198: 211-18, 2003.

ZHENG X., SHEN G., YANG X., LIU W. Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer Res*. 67: 3691-3697, 2007.

ZHI X., CHEN S., ZHOU P., SHAO Z., WANG L., OU Z., YIN L. RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. *Clin Exp Metastasis*. 24: 439-448, 2007.

ZHOU P., ZHI X., ZHOU T., CHEN S., LI X., WANG L., YIN L., SHAO Z., OU Z. Overexpression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol & Ther.* 6: 426-431, 2007.

ZIMMERMANN H. 5'- Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285: 345- 65, 1992.

ZIMMERMANN H. Signaling via ATP in the nervous system. *TINS.* 17: 420-26, 1994.

ZIMMERMANN H. Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52: 44-56, 2001.

ZIMMERMANN H. Ectonucleotidases in the nervous system. *Pur Signalling neuron-glia int.* 276:113-130, 2006.