

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

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ATP EXTRACELULAR E DAS
ECTO-NUCLEOTIDASES NO CRESCIMENTO DE GLIOMAS**

FERNANDA BUENO MORRONE

Orientadora

DRA. ANA MARIA O. BATTASTINI

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica do
Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial à obtenção do título de Doutor

Porto Alegre

2005

Ao Matheus,
para que tenha um futuro
cheio de descobertas e aventuras.

“Só a especulação ousada pode nos levar adiante, e não o acúmulo de fatos”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Ana por ter sido uma excelente orientadora e amiga, e pela sua compreensão maternal. Por ter se mostrado uma profissional extremamente competente e séria e por ser um exemplo de pesquisadora que tanto precisamos em nosso País.

Ao Dr. Guido Lenz pela ajuda e orientação em tantos momentos e principalmente por ser um excelente pesquisador.

À Paula porque é uma bolsista maravilhosa, presente em todos os momentos, para que possa seguir adiante e alcançar muitas conquistas.

À Joseli pelo companheirismo, pela ajuda em tantos experimentos e principalmente pela amizade.

À Patrícia pelo incansável e eficiente trabalho na padronização do modelo dos gliomas.

Ao Spiller, Márcia e Ana Paula pela excelente colaboração e coleguismo, foi um enorme prazer poder trabalhar com vocês.

À Vanessa, Luci, Elizandra, Alessandra, Andressa, Leandre e à Lila pelo apoio e amizade.

À Vanessa S. e Jerônimo porque são alunos fantásticos.

À Dra Maria Isabel e Dra Luise, pelas incansáveis contagens e análises histopatológicas que tanto contribuíram para que este trabalho pudesse se realizar.

À Neiva e Jorge do Laboratório de Pesquisa em Patologia, por sua ajuda técnica e prontidão que tornou possível este trabalho.

À Dr. Carlos Barrios, Dr. Alam Azambuja, Dra. Fabiana Viola e a todos os funcionários do setor de Oncologia do HSL por todo o apoio nestes últimos tempos.

À Profa Dra. Flávia Thiesen e aos colegas da PUC pela torcida, pelo apoio e incentivo durante todos estes anos.

À todos os colegas, professores e funcionários do Pós-Graduação em particular a Cléia pela sua competência e seriedade.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação.

Ao CNPq, PRONEX, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS.

À Chiara Lubich e todos os membros do Movimento dos Focolares que compartilham comigo a fé em uma sociedade mais fraterna e justa, por todo o apoio e orações.

À minha mãe Theresinha pelo amor e exemplo que me fizeram sempre perseverar.

Ao Felipe pelo amor, compreensão, carinho, amizade, por estar sempre presente, na alegria e na tristeza....., em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

Glioblastomas são a forma mais comum de tumores cerebrais primários e, apesar do tratamento, os pacientes com estes tumores têm um prognóstico muito ruim. Os nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e também a adenosina possuem muitas funções importantes em condições fisiológicas e patológicas em vários organismos. O ATP é uma importante molécula sinalizadora no SNC, e os nucleotídeos e nucleosídeos podem induzir a proliferação de linhagens celulares de gliomas. Na invasão dos gliomas dois mecanismos podem liberar ATP: a morte excitotóxica do tecido adjacente e a lesão causada pela ressecção do tumor, que é o tratamento de primeira linha nestes casos.

Neste estudo foram observados os efeitos do ATP extracelular na citotoxicidade em linhagens celulares de glioma humano U138 e na linhagem C6 de ratos, comparado com culturas organotípicas de hipocampo. A citotoxicidade do ATP (0.1mM, 0.5mM, 5mM) foi medida usando os ensaios de incorporação de iodeto de propídeo e ensaio da lactato desidrogenase. O ensaio de caspases foi realizado para identificar a morte apoptótica. Os resultados mostraram que as células de gliomas apresentam resistência a morte induzida pelo ATP quando comparados com o tecido normal. Altas concentrações de ATP (5mM) induziram à morte celular após 24 h de tratamento em culturas organotípicas, mas não nas linhagens de gliomas estudados.

Os nucleotídeos são hidrolisados muito lentamente pelas linhagens de gliomas, o que foi confirmado pela baixa expressão das enzimas NTPDases quando comparado com astrócitos. Portanto, para testar o papel do ATP extracelular no mecanismo de implante e crescimento dos gliomas, um milhão destas células de gliomas foram injetadas em 3µl de DMEM no estriado direito de ratos Wistar, e foi testada a co-injeção da enzima apirase no tratamento dos gliomas implantados. Após 20 dias, os ratos foram mortos e o cérebro foi seccionado e corado com hematoxilina e eosina. Nossos resultados mostraram que os ratos que sofreram co-injeção de apirase tiveram uma redução significativa no tamanho do tumor e menor índice mitótico ($p < 0,05$), bem como menor imunodeteção para Ki67, VEGF e CD31 quando comparado com os grupos controle e controle apirase.

A medida da hidrólise enzimática dos nucleotídeos no soro pode contribuir no diagnóstico de lesão celular em muitas condições patológicas. Com o objetivo de avaliar a atividade enzimática da ATPase, ADPase e AMPase *in vivo*, amostras de soro foram coletadas vinte dias após o implante dos gliomas em ratos. Os ratos com indução de gliomas mostraram um aumento significativo na hidrólise de ATP, ADP e AMP quando comparado com os respectivos controles. O tratamento com o fármaco temozolomida e com 10% dimetil sulfoxida diminuiu a hidrólise dos nucleotídeos. Nenhum dos animais incluídos neste trabalho apresentaram alterações significativas na atividade das enzimas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina.

Nossos dados indicam que o ATP pode ter uma função importante no crescimento do glioma, pois quando liberado pode induzir a morte celular do tecido normal ao redor do tumor, abrindo espaço para o rápido crescimento e invasão do tumor. As avaliações da hidrólise dos nucleotídeos da adenina no soro podem ajudar no acompanhamento da progressão dos tumores cerebrais.

ABSTRACT

Glioblastomas are the most common form of primary tumors of the brain and despite treatment, patients with these tumors have a very poor prognosis. Adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and also adenosine have many important functions in physiologic and pathological conditions in a variety of organisms. ATP is an important signaling molecule in CNS physiological conditions and nucleotides and nucleosides induce proliferation in glioma cell lines. In glioma invasion, two mechanisms can liberate ATP: first, the excitotoxic death of the surrounding tissue and second, the injury caused by tumor resection, which is the mainstay of initial therapy for gliomas.

In this study we examined the effects on cytotoxicity induced by extracellular ATP in U138-MG human glioma cell line and C6 rat glioma cell line compared to hippocampal organotypic cell cultures. The cytotoxicity of ATP (0.1mM, 0.5mM, 5mM) was measured using propidium iodide and lactate desidrogenase assays. Caspases assay was performed to identify apoptotic cell death. Results showed that the glioma cells present resistance to death induced by ATP when compared with a normal tissue. High ATP concentrations (5mM) induced cell death after 24 h treatment in organotypic cell cultures, but not in glioma cell lines studied.

Nucleotides are hydrolyzed very slowly by gliomas, what was confirmed by the low NTPDases enzymes expression when compared to astrocytes. To test the involvement of extracellular ATP on the implantation and growth of gliomas, one million cells of gliomas in 3µl of DMEM were injected in the right striata of male Wistar rats and the enzyme apyrase was tested on the treatment of implanted gliomas. Twenty days after, the rats were decapitated and the brain sectioned and stained with hematoxylin and eosine. Our results showed that the rats that suffered co-injection of apyrase had a significant reduction of the tumor size and of mitotic index ($p < 0.05$), as well as a smaller immunodetection of Ki67, VEGF and CD31 in comparison with the groups control and apyrase control.

The measurement of enzymatic hydrolysis of these nucleotides in blood serum may contribute in the diagnostic of cell injury in many pathological conditions. To evaluate the hydrolysis of the nucleotides ATP, ADP and AMP *in vivo*, blood serum samples were collected twenty days after glioma implantation in rats. The rats with glioma induction showed a significant increase in blood serum hydrolysis of ATP, ADP and AMP when compared with the respective controls. The treatment with temozolomide and with 10% dimethyl sulfoxide decreased the nucleotide hydrolysis. None of the animals included in this work presented significant alterations in the activity of the enzymes alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase.

Our data indicate that ATP can have an important role on glioma growth. ATP released in these situations can induce cell death of the normal tissue surrounding the tumor, opening space to the fast growth and invasion of the tumor. The evaluation of nucleotide hydrolysis in the blood serum may help in the accompaniment of brain tumor progression.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	GLIOMAS E SUA CLASSIFICAÇÃO.....	3
1.1.1.	GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	6
1.1.2	CRESCIMENTO E INVASÃO DE GLIOMAS.....	7
1.1.3	MECANISMOS MOLECULARES E O DESENVOLVIMENTO TUMORAL.....	9
1.1.4	TRATAMENTO DOS GLIOMAS.....	12
1.2	NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES.....	15
1.2.1	RECEPTORES P1 E P2.....	16
1.2.2	AS FUNÇÕES DOS NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES.....	19
1.2.3	ADENOSINA E SUAS FUNÇÕES.....	22
1.3	AS ECTO-NUCLEOTIDASES.....	25
1.3.1	A FAMÍLIA E-NTPDase.....	28
1.3.2	A 5'-NUCLEOTIDASE.....	32

1.3.3	OS TUMORES E AS ECTO-NUCLEOTIDASES.....	33
2	OBJETIVOS.....	35
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	36
3.1	CAPÍTULO 1.....	36
3.2	CAPÍTULO 2.....	43
3.2.1	ANEXO.....	70
3.3	CAPÍTULO 3.....	81
4	DISCUSSÃO.....	105
4.1	EFEITO DO ATP EXTRACELULAR NA MORTE DE LINHAGENS DE GLIOMAS E CULTURAS ORGANOTÍPICAS.....	105
4.2	O CRESCIMENTO E INVASÃO DE CÉLULAS TUMORAIS EM MODELO DE GLIOMAS.....	109
4.3	AÇÃO DA APIRASE NO CRESCIMENTO E INVASÃO DOS GLIOMAS.....	111
4.4	ATPase, ADPase E AMPase EM SORO DE RATOS.....	116

4.5	O ENVOLVIMENTO DO SISTEMA PURINÉRGICO NO DESENVOLVIMENTO DOS GLIOMAS: ALGUMAS PERSPECTIVAS.....	119
5	CONCLUSÕES.....	122
5.1	GERAIS.....	122
5.2	ESPECÍFICAS.....	122
6	PERSPECTIVAS.....	124
7	PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO DOUTORADO.....	125
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de sinalização alteradas por mutações em gliomas humanos.....	11
Figura 2. Vias de mitose alvo em gliomas.....	14
Figura 3. O controle da mitogênese pela MAPK via receptor P2Y.....	20
Figura 4. Representação esquemática dos receptores purinérgicos expressos por astrócitos.....	21
Figura 5. As maiores vias envolvidas no metabolismo da adenosina.....	23
Figura 6. Vias de degradação dos nucleotídeos.....	26
Figura 7. Topografia de membrana das ecto-nucleotidases.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de sobrevivência média e modalidade de tratamento para gliomas.....	5
Tabela 2. Características dos receptores purinérgicos.....	18
Tabela 3. Nomenclatura e preferência de substrato para os membros da família E-NTPDase em vertebrados.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS¹

ADP- *adenosine 5'-diphosphate*, adenosina difosfato;
AKT- *antiapoptotic factor*, fator anti-apoptótico;
AMP - *adenosine 5'-monophosphate*, adenosina monofosfato;
ATP - *adenosine triphosphate*, adenosina trifosfato;
BHE - barreira hematoencefálica;
CD39 - antígeno de ativação celular linfóide;
CDK - *cyclin dependent kinase*, quinase ciclina-dependente;
CTP - *cytidine triphosphate*, citidina trifosfato;
DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, meio de cultura de células²;
DMSO- *dimethyl sulfoxide*, dimetil sulfoxida;
Ecto-5'NT - ecto-5' nucleotidase;
E-NPP family - *ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family*, família ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase;
E- NTPDase family - *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family*, família ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase;
EGF- *epidermal growth factor*, fator de crescimento de epiderme;
EGFR - *epidermal growth factor receptor*, receptor de fator de crescimento de epiderme;
ERK- *extracellular signal-regulated protein kinase*;
FAL - *alkaline phosphatase*, fosfatase alcalina;
FCS - *fetal calf serum*, soro fetal bovino;
FGF- *fibroblast growth factor*; fator de crescimento de fibroblastos;
FGFR - *fibroblast growth factor receptor*, receptor de fator de crescimento de fibroblastos;
GBM - glioblastoma multiforme;

¹ Abreviaturas citadas somente uma vez não estão listadas.

² Quando aplicável será citada a principal característica.

GFAP- *glial fibrillary acidic protein*, componente do filamento intermediário e específico de astrócitos;

GPCR- *G protein-coupled receptor*; receptor ligado à proteína G;

GTP - *guanosine triphosphate*, guanosina trifosfato;

cGy - unidade de medida para raios gama;

IP₃ - *inositol (1,4,5)-triphosphate*, inositol trifosfato;

INK4a-ARF - gene supressor tumoral;

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*;

MDM2 - *gene Murine Double Minute 2* (degrada p53);

mRNA- *messenger RNA*, RNA mensageiro;

mTOR - *mammalian target of rapamycin*;

P2X- *ionotropic purinoceptor*, receptor purinérgico ionotrópico;

P2Y- *metabotropic purinoceptor*, receptor purinérgico metabotrópico;

PDGF- *platelet-derived growth factor*, fator de crescimento de plaquetas;

PTEN - *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*;

Pi - fosfato inorgânico;

PPi - pirofosfato inorgânico;

PIP2 - *phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate*, fosfatidilinositol 4,5-difosfato;

PIP3 - *phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate*, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato;

PKC - *protein kinase C*; proteína quinase C;

p53 - gene supressor tumoral;

RB - retinoblastoma;

RB2 - *reactive blue 2*;

RT- radioterapia;

RT-PCR- *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*;

SNC - Sistema Nervoso Central;

Suramina - *8-(3-benzamido-4-methylbenzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid*;

TCA - *trichloroacetic acid*, ácido tricloroacético;

UDP- *uridine 5'-diphosphate*, uridina difosfato;

UTP- *uridine 5'-triphosphate*, uridina trifosfato;

VEGF - *vascular endothelial growth factor*, fator de crescimento vascular endotelial.

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS E SUA CLASSIFICAÇÃO

Os gliomas são atualmente um dos grandes desafios da oncologia (Rich e Bigner, 2004). Estes são os tumores cerebrais primários mais comuns em adultos e representam mais de 40% de todos os neoplasmas do Sistema Nervoso Central (Dai e Holland, 2001).

Os gliomas são derivados de astrócitos, oligodendrócitos e seus precursores no SNC, apresentando morfologia e expressão gênica semelhantes a estas células (Collins, 1998; Chintala et al., 1999). Recentemente, foram identificadas células-tronco de tumores cerebrais com diferentes fenótipos, capazes de gerar este tipo de tumor sólido (Singh et al., 2004). A radiação ionizante permanece o fator de risco ambiental mais aceito, que pode estar relacionado com a formação tumoral (Ron et al., 1988).

Entre os sintomas clínicos mais frequentes tem-se observado cefaléia, mudanças cognitivas, papiloedema, disfasia ou hemiparesia progressiva (Todd et al., 1987; Laws e Shaffrey, 1999; Girolami et al., 2000). Não está claro como o crescimento da massa tumoral cause danos ao longo das margens do tumor em crescimento, entretanto, convulsões epiléticas, que são indicadores de função neuronal comprometida, ocorrem frequentemente em pacientes com tumores cerebrais (De Angelis, 2001). A liberação de glutamato pelas células gliais em concentrações neurotóxicas pode ser responsável em parte pelas convulsões associadas que ocorrem em pacientes com gliomas (Ye e Sontheimer, 1999).

O Sistema de Classificação de tumores cerebrais da Organização Mundial da Saúde (OMS) utiliza quatro graus para descrever os gliomas, baseados na malignidade das células, nas suas características invasivas e na capacidade de necrose (Collins, 1998; Chintala, 1999). São classificados em astrocitoma pilocítico, astrocitoma de baixo grau, o astrocitoma anaplástico (AA) e glioblastoma multiforme (GBM), como será explicado a seguir (Cambier et al., 1988; Laws e Shaffrey, 1999; Holand, 2001).

Astrocitomas são tumores compostos predominantemente por astrócitos neoplásicos. Astrocitomas pilocíticos (grau I) são tumores relativamente benignos que geralmente ocorrem em crianças e adultos jovens. Raramente progridem para anaplasia e geralmente estão localizados nos nervos óticos, terceiro ventrículo, tálamo, lobo temporal médio, tronco cerebral e cerebelo (Duarte et al., 1994). Os astrocitomas de baixo grau (grau II) podem aparecer em qualquer local do SNC, incluindo a medula espinhal, mas são mais comuns nos hemisférios cerebrais e tendem a infiltrar-se difusamente no parênquima cerebral ao redor do tumor (Collins, 1998; Girolami et al., 2000). Os astrocitomas anaplásticos (grau III) são caracterizados por astrócitos fibrilares ou gemistocíticos, podendo progredir rapidamente a glioblastoma. Finalmente, os glioblastomas multiforme (grau IV) são mais freqüentemente encontrados na região frontotemporal, mas também podem afetar os lobos parietais, sendo os tumores cerebrais de maior malignidade (Chintala et al., 1999; Laws e Shaffrey, 1999; Holland, 2001; Dai e Holland, 2001).

A sobrevida média dos pacientes com tumores cerebrais é de cinco anos, apresentando a terceira mais baixa entre todos os tipos de câncer (pâncreas e pulmão têm a primeira e a segunda, respectivamente) (Avgeropoulos e Batchelor, 1999). Conforme se demonstra na Tabela 1, o prognóstico para pacientes com gliomas malignos (astrocitoma anaplástico e glioblastoma multiforme) permanece obscuro: a sobrevida média de pacientes

com AA é de 2 a 3 anos, e para pacientes com GBM é de 10 a 12 meses (Davis et al., 1999). Nos astrocitomas de baixo grau (Grau II) a sobrevida é altamente variável, com uma média de 5 a 10 anos (Keles et al., 2001) e os astrocitomas pilocíticos (Grau I), são curáveis por cirurgia e em tumores sintomáticos que não podem sofrer ressecção, utiliza-se radiação e quimioterapia (Edmonson, 1995; Holland, 2001).

Tabela 1 -Taxa de sobrevida média e modalidade de tratamento para gliomas

Tipo Tumoral	Modalidade de tratamento	Sobrevida Média
Glioma de baixo grau*	Ressecção total grosseira	5-7 anos
	Biópsia/cirurgia subtotal	35% em 5 anos
	Cirurgia total + RT	46% em 5 anos
Astrocitoma cerebelar	Cirurgia	Alta taxa de cura
Glioma óptico	Cirurgia	>10 anos
	Cirurgia + RT	>10 anos
Astrocitoma anaplástico	Cirurgia somente	1 ano
	Cirurgia + RT	2-3 anos
	Cirurgia + RT + quimio	3-5 anos
Glioblastoma	Cirurgia somente	4 meses
	Cirurgia + RT	9 meses
	Cirurgia + RT + quimio	9-10 meses
Oligodendroglioma	Cirurgia	30% em 5 anos
	Cirurgia + RT	85% em 10 anos
		55% em 10 anos
Ependimoma (diferenciado) (anaplástico)		10 anos
	Cirurgia + RT	2-5 anos #

* A localização e a ressecabilidade ditam a sobrevida.

O ependimoma maligno com ressecção subtotal e invasão do líquido ditam um prognóstico pobre, enquanto a ressecção total grosseira de um ependimoma supratentorial com achados liquorícos negativos ditam um prognóstico mais longo.

RT= radioterapia.

Adaptado de Edmonson (1995).

1.1.1 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral primário mais comum e mais letal (grau IV) (Laws e Shaffrey, 1999). A incidência destes gliomas malignos é de 5 a 10 para cada 100.000 pessoas (Legler et al. 1999, Wrensch et al, 2002). Estes tumores são mais freqüentes em homens do que em mulheres, e têm aumentado entre os idosos por razões não conhecidas, representando acima de 50% após os 60 anos (Edmonson, 1995; Dai e Holland, 2001).

Glioblastomas são quase sempre infiltrativos e comumente apresentam características multifocais (Dai, Holland, 2001). Como o próprio nome diz, glioblastoma é multiforme, já que apresenta regiões de necrose e hemorragia, além de diversas alterações microscópicas (Holland, 2000). Os GBMs possuem várias características histopatológicas, incluindo células gigantes, pleomorfismo celular e nuclear, proliferação microvascular, e necrose com pseudopaliçada. Eles incluem também alta proliferação com atividade mitótica e proliferação endotelial (Laws e Shaffrey, 1999). A maioria dos GBMs expressam marcadores de diferenciação astrocítica (ex. GFAP, S-100 β) (Holland, 2000; Dai e Holland, 2001).

Estes tumores são sensíveis à radioterapia, mas raramente são curados somente com o tratamento radioterápico podendo-se utilizar a combinação com os agentes quimioterápicos (Laws e Shaffrey, 1999). Quase todos os pacientes com GBM morrem devido à sua patologia e apresentam uma sobrevida média de um ano (Dai e Holland, 2001).

1.1.2 CRESCIMENTO E INVASÃO DE GLIOMAS

Os gliomas surgem através de processos de proliferação e invasão e causam danos ao tecido cerebral circundante, resultando em uma deformação e destruição da arquitetura do cérebro que leva à morte do paciente (Ridder, 1999).

A proliferação incontrolada de células gliais resulta em tumores primários cerebrais, sendo a maioria originada através de transformações neoplásicas de astrócitos (Lipton e Rosenberg, 1994; Paulus e Tonn, 1995). Sabe-se que o comportamento biológico dos tumores cerebrais, com um número de alterações genéticas, muda durante a chamada progressão maligna (Lipton e Rosenberg, 1994; Paulus e Tonn, 1995; Ridder, 1999).

É sabido que a maioria dos tumores cerebrais primários não metastatizam e raramente disseminam através do fluido cérebro espinhal (Monteiro, 1996). Entretanto, os gliomas malignos são caracterizados patologicamente por uma grande infiltração do tecido cerebral normal circundante (Rao et al., 2001). O crescimento dos gliomas pode matar as células neuronais do tecido circundante através da liberação de glutamato (Takano et al., 2001). Estudos demonstraram que as células de gliomas não têm a habilidade de remover o glutamato do espaço extracelular, e, além disso, elas liberam glutamato em concentrações que podem levar a neurotoxicidade (Ye e Sontheimer, 1999).

A invasão dos gliomas consiste de uma série de etapas complexas, envolvendo alterações na interação das células tumorais com ligações específicas da matrix extracelular (MEC), proteólise da matrix por enzimas proteolíticas e subsequente migração de células através das estruturas degradadas (Ruoslahti, 1992; Kohn e Liotta, 1995). No processo invasivo as células devem cruzar uma barreira extracelular, elas primeiro se ligam à matrix, criando um defeito proteolítico nesta estrutura e finalmente através deste defeito ocorre a

translocação ativa de células tumorais (Chintala et al., 1999; Kaczarek et al., 1999). Portanto, a invasão de gliomas está baseada em modificações de células de adesão. Numerosos estudos têm demonstrado uma associação intimamente ligada entre a expressão de várias proteases, como as serina proteases, as metaloproteinases (MMPs) e a ativação do sistema plasminogênio/plasmina, e o comportamento invasivo dos gliomas (Chintala et al., 1999). Ativação de metaloproteinases da matrix (MMP-2/-9) é observada em gliomas de alto grau, mas não em gliomas de baixo grau (Amberger et al., 1998).

Conforme mencionado anteriormente, necrose focal e neovascularização são aspectos consistentes dos gliomas de alto grau (Goldman et al., 1993). A este respeito, um outro elemento importante no crescimento dos tumores é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que é o mais proeminente fator de crescimento angiogênico. É produzido por quase todos os tumores sólidos: seus receptores são altamente expressos em células endoteliais vasculares e predominantemente em vasos nas proximidades do tumor (Olofsson et al., 1999). Deste modo, o tumor pode crescer e células tumorais em migração alcançam a circulação através destes vasos novos e permeáveis. Apesar da neovascularização capilar exuberante, a circulação sanguínea muito freqüentemente não é suficiente para áreas tumorais com grande proliferação celular. Isto indica que suplementação vascular insuficiente pode se tornar o fator limitante do crescimento tumoral o que leva ao desenvolvimento de necrose intratumoral (Schaper e Buschmann, 1999).

1.1.3 MECANISMOS MOLECULARES E O DESENVOLVIMENTO TUMORAL

Várias alterações de expressão gênica e anormalidades cromossômicas são comumente encontradas nos gliomas e, em alguns casos estas mutações estão relacionadas com os graus clínicos dos tumores cerebrais (Holland, 2001).

Em tumores de baixo grau, estão superexpressos vários fatores de crescimento e seus receptores. Entre eles estão o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado de fibroblastos (FGF-2) e fator de crescimento ciliar de neutrófilos (CNTF), além disso, a proteína P53 freqüentemente se encontra mutada nestes tumores. Adicionalmente, os tumores de grau III mostram deficiência de INK4a-ARF, amplificação de quinase 4 ciclina-dependente (CDK4) ou perda do retinoblastoma (RB), fazendo com que haja alterações nos sistemas de controle do ciclo celular (Collins, 1998; Holland, 2001).

O maior número de alterações genéticas é encontrado nos glioblastomas multiforme. Além de todas as alterações citadas acima, estes tumores mostram a perda da região 10q-22-25, uma região cromossômica que carrega vários genes supressores tumorais, principalmente PTEN (Collins, 1998; Holland, 2001). Além disso, os tumores cerebrais podem surgir como resultado de acumulação gradual de anormalidades genéticas em células precursoras, incluindo perda ou inativação do gene supressor tumoral p16 ou superexpressão de certos receptores de proteases, como plasminogênio ativador de uroquinase (uPA) (Chintala et al., 1999).

Em gliomas humanos, a maioria das alterações genéticas identificadas até agora, resultam em ativação anormal de vias de transdução de sinal *downstream* dos receptores tirosina quinase ou interrupção das vias de parada do ciclo celular (Figura 1A). Por

exemplo, a amplificação ou ativação de mutações dos receptores de EGF (EGFR) (Wong et al., 1987; Wong et al., 1992), superexpressão de FGF-2 (Takahashi et al., 1990; Yamaguchi et al., 1994), e PDGF e/ou receptores de PDGF (PDGFR) (Fleming, et al., 1992; Smith et al., 2000). Todos levando à ativação constitutiva do receptor de sinalização tirosina quinase correspondente. A estimulação destes receptores poderia, potencialmente, ativar simultaneamente múltiplas vias de transdução de sinal *downstream*, incluindo a via PI3 quinase/AKT, via RAS/MAP quinase, via C-MYC, via da proteína quinase C, e vias STAT. Da mesma forma, deleção de PTEN (Li et al., 1997; Duerr et al., 1998), freqüentemente encontrada em gliomas de alto grau, também resulta na ativação de AKT devido à liberação do controle negativo de fosforilação de AKT (Stambolic et al., 1998). Embora a ativação combinada das vias abaixo de AKT e RAS seja capaz de induzir a formação de GBM em camundongos, em gliomas humanos não se tem observado a ativação de mutações na RAS e AKT. Entretanto, a atividade destas proteínas tem sido mostrada estar elevada nestes tumores (Guha, 1998; Haas-Kogan, et al., 1998; Holland et al., 2000), presumivelmente devido a freqüente ativação acima dos receptores tirosina quinases. Portanto, a ativação combinada destas vias parece relevante para a biologia da formação dos gliomas mesmo que o mecanismo para alcançar a elevada atividade de RAS e AKT seja diferente entre humanos e os modelos animais (Dai e Holland, 2001).

O outro maior grupo de alterações resulta na interrupção das vias de parada do ciclo celular, como a deleção de INK4A-ARF (Giani e Finocchiaro, 1994), deleção de RB (Newcomb et al., 2000), perda das funções do P53 (Henson et al., 1994) amplificação de CDK4 (Rollbrocker et al., 1996), CDK6 (Costello et al., 1997), ciclina D1 (Buschges et al., 1999) e MDM2 (Reifenberger et al., 1993) (Figura 1B). Todos estes genes estão envolvidos

no controle da progressão do ciclo celular. Em gliomas de alto grau, perda das funções de INK4A-ARF e P53 são as alterações mais frequentemente identificadas.

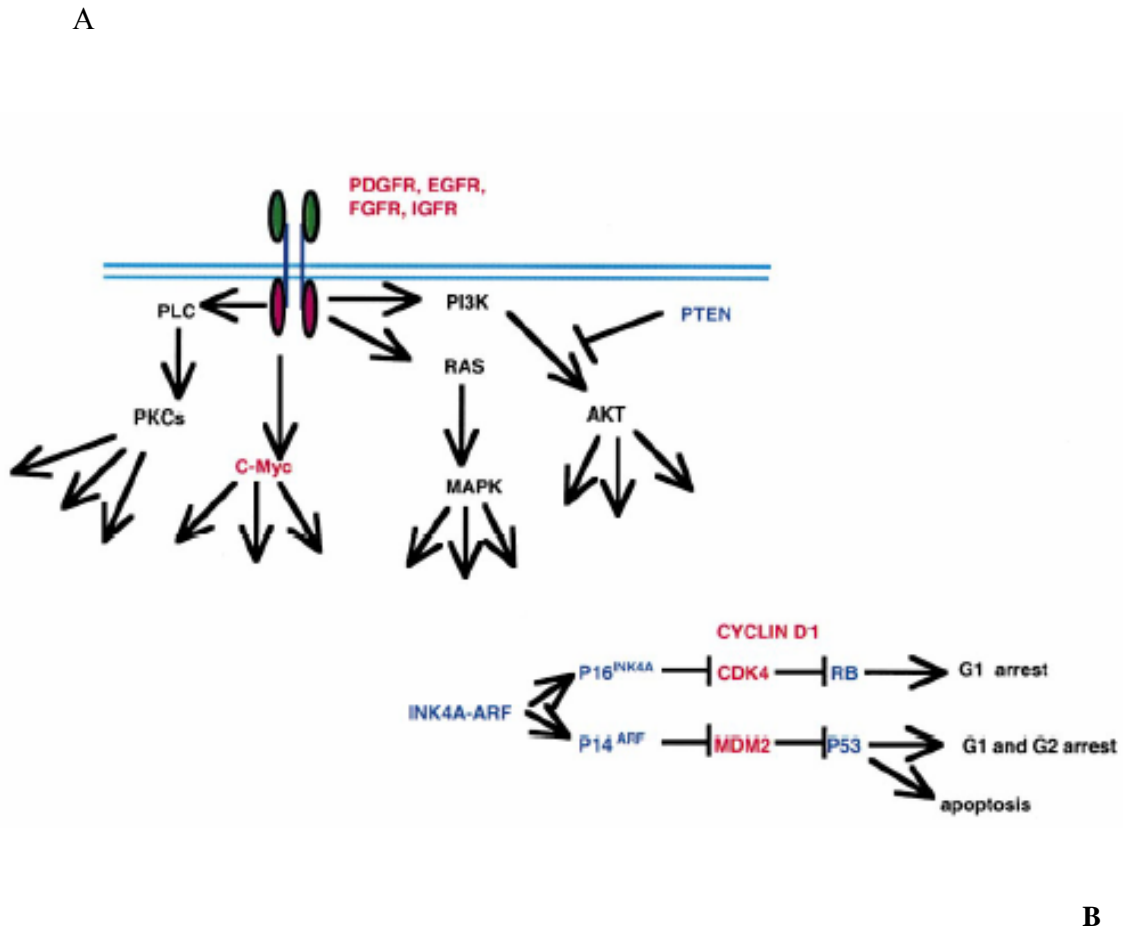


Figura 1. Vias de sinalização alteradas por mutações em gliomas humanos. Resumo das maiores alterações genéticas identificadas em gliomas humanos. Estas mutações afetam tanto transdução de sinal (A) ou as vias de parada do ciclo celular (B). As proteínas que são codificadas por genes que estão implicados em ganho de função dos efeitos oncogênicos estão em vermelho, enquanto que as proteínas que são codificadas por genes que funcionam como perda da função de gene supressores tumorais, em azul.

Adaptado de Dai e Holland (2001).

1.1.4 TRATAMENTO DOS GLIOMAS

O diagnóstico dos tumores cerebrais é geralmente feito por estudos de imagem (ressonância magnética e tomografia computadorizada), seguido de biópsia (McKeran e Thomas, 1980; Todd et al., 1987). Como apresentado anteriormente, o tratamento inicial para estes tumores é a cirurgia, associada à radioterapia, e, seguida ou não de quimioterapia (Brandes et al., 2000).

O tratamento cirúrgico dos gliomas está comprometido pela natureza invasiva destas células tumorais, sendo a infiltração no tecido cerebral adjacente um fator limitante da ressecção cirúrgica (Grobben et al., 2002). Desta forma, a recorrência do tumor é quase inevitável já que a remoção cirúrgica do tumor invariavelmente deixa uma população residual de células das quais novos tumores podem crescer (Rooprai et al., 1999), levando metade dos pacientes à morte dentro de três meses (Gregor e Cull, 1996). Portanto, deve-se fazer o esforço para a realização da ressecção total do tumor, já que a extensão do volume de tumor residual depois da cirurgia está diretamente relacionada com o tempo de sobrevida dos pacientes (Weiss, 1995).

Como citado acima, a cirurgia geralmente é seguida de radioterapia, aplicada em pequenas frações diárias até uma dose total 60 cGy (Laws e Shaffrey, 1999; De Angelis, 2001). Embora a radioterapia não seja curativa, ela melhora os sintomas e aumenta a sobrevida dos pacientes, justificando o uso contínuo de irradiação pós-operatória em tumores malignos (Walker et al., 1980; Weiss, 1995). Entretanto, nos gliomas malignos que se infiltram no tecido cerebral, o modo predominante de falha no tratamento com radioterapia está no local de origem (Sneed et al., 1994). Acredita-se que algumas células

invasivas podem ficar “dormentes” e compartilhar características com as células normais do cérebro (Laws e Shaffrey, 1999).

Os princípios da quimioterapia de tumores cerebrais têm características particulares devido à barreira hematoencefálica (BHE) que limita o acesso de alguns agentes quimioterápicos. Portanto, agentes citotóxicos que penetram a BHE (inibidores da topoisomerase I, temozolomida, oxaliplatina) são agentes terapêuticos promissores. Estratégias para acessar a BHE (polímeros, análogos da bradicinina, terapia gênica) são avanços importantes que também têm mostrado eficácia em estudos clínicos (Avgeropoulos e Batchelor, 1999; Buolamwini, 1999).

Embora grande parte dos quimioterápicos tenha ação sistêmica, métodos focais e regionais foram desenvolvidos na forma de quimioterapia intra-arterial e uso de partículas biodegradáveis impregnadas com as drogas (Laws e Shaffrey, 1999).

O desenvolvimento da biologia molecular tem levado a clarear o entendimento dos mecanismos de desenvolvimento do tumor, crescimento e resistência da terapia. Estão emergindo novas estratégias com alvo de tratamento na patogênese molecular destes tumores (Rich e Bigner, 2004) (Figura 2). Agentes antiangiogênese, oligonucleotídeos antisense e inibidores de transdução de sinal são todos exemplos de tais terapias (Avgeropoulos e Batchelor, 1999; Rich e Bigner, 2004).

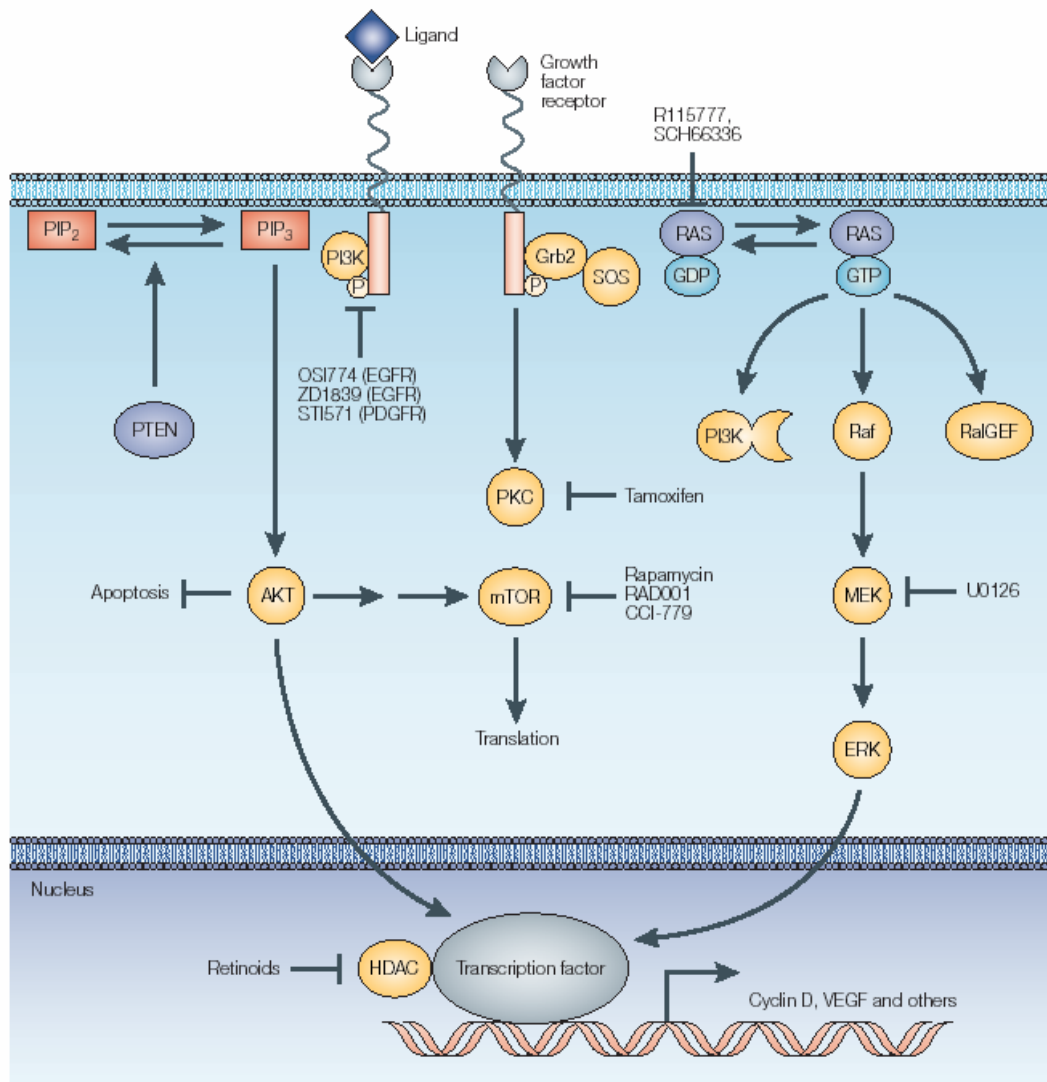


Figura 2. Vias de mitose alvo em gliomas. Várias vias de fator de crescimento são ativadas imprópriamente nos gliomas, incluindo EGF, PDG e VEGF. Cada família de fator de crescimento constitui vários membros ligados a receptores transmembrana contendo domínios extracelulares, e domínios citoplasmáticos que possuem atividade proteína quinase. A ligação aos receptores induz a fosforilação de resíduos de tirosina que permitem a ligação de proteínas que atuam com transdutores de sinais ou moduladores. Estes efetores podem induzir a atividade de várias vias de transdução incluindo, RAS, MAPK e AKT. Várias destas cascatas são alvos de novas terapias para os gliomas. ERK, *extracellular signal-regulated protein kinase*; GEF, *guanine exchange factor*; HDAC, *histone deacetylase*; MEK, *MAP/ERK-kinase*; mTOR, *mammalian target of rapamycin*; PIP2, *phosphatidylinositol (4,5) biphosphosphate*; PIP3, *phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate*; PKC, *protein kinase C*; PTEN, *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*.

Adaptado de Rich e Bigner (2004).

1.2 NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES

As purinas e pirimidinas extracelulares são moléculas sinalizadoras que apresentam diversos efeitos sobre muitos processos biológicos, incluindo neurotransmissão, contração de músculo liso, secreção, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dor, modulação da função cardíaca, entre outros (Ralevic e Burnstock, 1998).

Existem duas rotas principais pelas quais os nucleotídeos podem atingir o compartimento extracelular (Bodin e Burnstock, 2001). A primeira é por exocitose e a segunda pela lise celular. Existem numerosos estudos que provam que o ATP armazenado nas vesículas sinápticas é liberado como um co-transmissor dos nervos terminais por exocitose (Zimmermann, 1994). Uma terceira rota sugere que em algumas células não neuronais poderia ocorrer a liberação mediada de ATP que envolveria *ATP-binding cassette proteins* (ABC), uma família de ATPases transportadoras. Entretanto, o exato mecanismo deste processo permanece obscuro (Bodin e Burnstock, 2001). Uma vez liberados, os nucleotídeos interagem com diferentes receptores de nucleotídeos e finalmente são degradados por várias ecto-enzimas (Grobber et al., 1999).

O ATP e seu produto de degradação, adenosina, ativam receptores específicos, na maioria das células, para mediar diversas respostas funcionais (Khakh e Kennedy, 1998). Existem duas principais famílias de receptores, os receptores de adenosina ou do tipo P1, e os receptores do tipo P2, que reconhecem principalmente o ATP e o UTP e seus análogos difosfatados, conforme será explicado a seguir (Burnstock, 2001).

O ATP e os seus produtos de degradação, particularmente o ADP e a adenosina, formam uma cascata envolvida na regulação da comunicação célula-célula, que pode

funcionar diminuindo as conseqüências do trauma de tecido, como a isquemia (Williams e Jarvis, 2000). A adenosina é um nucleosídeo endógeno das purinas que exerce vários efeitos biológicos que freqüentemente contrastam com as funções dos receptores P2. Por exemplo, a adenosina tem propriedades antiagregantes e antiinflamatórias (Klinger et al., 2002), como será descrito posteriormente.

1.2.1 RECEPTORES P1 E P2

Os nucleotídeos extracelulares interagem com receptores presentes na superfície da membrana celular. A vasta família destes receptores foi primeiramente denominada “purinérgica” (Burnstock, 1972; 1978; Ralevic e Burnstock, 1998). Até o momento, foram clonados e caracterizados 15 receptores P2 (Dubyak e Elmoatassim, 1993; Muller, 2002; Abbracchio et al., 2003), bem como 4 subtipos de receptores de adenosina (P1) (Fredholm et al., 2001; Klinger et al., 2002) (Tabela 2).

Os receptores P1 de adenosina são todos membros da família dos receptores ligados à proteína G (Fredholm et al., 2001). Os genes para estes receptores foram analisados e detalhados, e os receptores desta família foram designados como A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, conforme já citado anteriormente. Embora a adenosina esteja continuamente presente no espaço extracelular em baixas concentrações, condições de estresse metabólico aumentam dramaticamente os seus níveis extracelulares (Olah e Stiles, 1995; Baraldi e Borea, 2000). Ao contrário dos receptores da adenosina, os receptores P2 são divididos em dois grupos bem distintos: em ionotrópicos (P2X) e em metabotrópicos (P2Y) (Dubyak, 1991; Abbracchio e Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1997; Boarder e Hourani, 1998; Boeynaems et al., 2000).

A maioria dos receptores P2X está distribuída distintamente nos neurônios centrais e periféricos (Burnstock, 2001). Até o momento, foram identificados sete receptores (P2X₁-P2X₇), sendo que um receptor funcional é formado por três subunidades, possibilitando assim a formação de receptores heteroméricos. Isto pode ser explicado pelo fato de que muitos destes receptores são expressos na mesma célula, produzindo um grande número de receptores com características farmacológicas e funcionais diferenciadas (Ralevic e Burnstock, 1998). O ATP é o principal agonista, sendo que os outros nucleotídeos (ADP, UTP, UDP) não possuem afinidade ou possuem uma afinidade muito reduzida pelos receptores P2X (Idelson, 2001).

Os receptores metabotrópicos P2Y são receptores purínicos e pirimidínicos que se caracterizam por estarem acoplados à proteína G (Ralevic e Burnstock, 1998; Burnstock, 2001). Eles têm sete domínios transmembrana, um N-terminal extracelular e um C-terminal intracelular. Vários receptores P2Y foram clonados, incluindo os receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e o receptor P2Y₁₄. Os receptores P2Y expressos têm sido distinguidos farmacologicamente pela ordem de efetividade dos agonistas, alguns preferindo pirimidinas a purinas (Burnstock, 2001). Os receptores purinérgicos reconhecidos até o momento, a sua principal distribuição, e os agonistas e antagonistas são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Características dos receptores purinérgicos³

Receptor	Distribuição	Agonistas	Antagonistas
P1 (adenosina)			
A1	Cérebro, medula espinhal, testículos, coração, nervos terminais autonômicos	CCPA, CPA	DPCPX, CPX, XAC
A2A	Cérebro, coração, pulmões, baço	CGS21680	KF17837, SCH58261
A2B	Intestino grosso, bexiga	NECA	<i>Enprofylline</i>
A3	Pulmão, fígado, cérebro, testículos, coração	IB-MECA, DBX RM	MRS1220, L268605
P2X			
P2X1	Musculatura lisa, plaquetas, cerebelo, neurônios dorsais e espinhais	$\alpha, \beta\text{meATP} = \text{ATP} = 2\text{meSATP}$ (desensibilização rápida)	TNP-ATP, IP5I, NF023
P2X2	Musculatura lisa, SNC, retina, células cromafins, glia autonômica e sensorial	$\text{ATP} \geq \text{ATP}\gamma\text{S} \geq 2\text{meSATP} \gg \alpha, \beta\text{meATP}$	Suramina, PPADS
P2X3	Neurônios sensoriais, NTS, alguns neurônios simpáticos	$2\text{meSATP} \geq \text{ATP} \geq \alpha, \beta\text{meATP}$	TNP-ATP, suramina, PPADS
P2X4	SNC, testículo, cólon	$\text{ATP} \gg \alpha, \beta\text{meATP}$	-
P2X5	Células proliferativas na pele, intestino, bexiga, timo, medula espinhal	$\text{ATP} \gg \alpha, \beta\text{meATP}$	Suramina, PPADS
P2X6	SNC, neurônios motores	(does not function as homomultimer)	-
P2X7	Células imunes em apoptose, pâncreas, pele, entre outros	$\text{BzATP} > \text{ATP} \geq 2\text{meSATP} \gg \alpha, \beta\text{meATP}$	KN62, KN04, <i>Coomassie brilliant blue</i>
P2Y			
P2Y1	Células epiteliais e endoteliais, plaquetas, células imunes, osteoclastos	$2\text{meSADP} > 2\text{meSATP} = \text{ADP} > \text{ATP}$	MRS2279, MRS2179
P2Y2	Células imunes, epiteliais e células endoteliais, túbulos renais, osteoblastos	$\text{UTP} = \text{ATP}$	Suramina
P2Y4	Células endoteliais	$\text{UTP} \geq \text{ATP}$	RB2, PPADS
P2Y6	Algumas células epiteliais, placenta, células T, timo	$\text{UDP} > \text{UTP} \gg \text{ATP}$	RB2, PPADS, suramina
P2Y11	Baço, intestino, granulócitos	$\text{ARC67085MX} > \text{BzATP} \geq \text{ATP}\gamma\text{S} > \text{ATP}$	Suramina, RB2
P2Y12	Plaquetas	ADP	ARC67085MX ARC69931MX

Abreviaturas: $\alpha, \beta\text{me-ATP}$, $\alpha, \beta\text{-methylene ATP}$; 2meSATP, 2-methylthioATP; CCPA, 2-chloro-N 6-cyclopentyladenosine; CPA, N 6-cyclopentyladenosine; CPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; DBXRM, 1,3-dibutylxanthine-1-riboside-5'-N-methylcarboxamide; DPCPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; Ins(1,4,5)P3, inositol (1,4,5)-trisphosphate; IB-MECA, N6-(3-iodobenzyl)-5'-N-methylcarboxamidoadenosine; IP5I, diinosine pentaphosphate; NECA, N-ethylcarboxamidoadenosine; NTS, nucleus of the solitary tract; PLC- β , phospholipase C- β ; PPADS, pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid; TNP-ATP, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate; XAC, xanthine amine congener.

Adaptado de Burnstock (2001).

³ Nesta tabela não estão descritos os receptores recentemente clonados P2Y₁₃ e P2Y₁₄.

1.2.2 AS FUNÇÕES DOS NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES

No sistema nervoso central, periférico e entérico, as purinas extracelulares e, em menor escala, as pirimidinas demonstram funções como neurotransmissores e neuromoduladores. Além disso, purinas extracelulares podem atuar como fatores tróficos com o potencial de regular o desenvolvimento neuronal, a proliferação e a apoptose da glia e células capilares endoteliais do cérebro, a plasticidade neural e a resposta do sistema nervoso a processos patológicos (Neary et al., 1996). Sabe-se que todas as células do sistema imunológico e inflamatório expressam receptores purinérgicos e que a sua expressão é modulada durante o desenvolvimento e por citocinas inflamatórias (De Mendonça et al., 2000).

As células são capazes de liberar ATP em resposta a vários agonistas, incluindo o próprio ATP (Lemmens et al., 1996). Conforme já foi citado, os nucleotídeos presentes em todas as células podem ser liberados através de diferentes mecanismos: excitose, transporte via proteínas intrínsecas da membrana plasmática tais como as glicoproteínas, ou lise celular. Forças mecânicas aplicadas às células, como estresse pela raspagem, por exemplo, também mostraram causar a liberação intracelular do ATP (Abraham et al., 1993; Gordon, 1986; Grierson e Meldolesi, 1995). Em algumas condições patológicas, grandes quantidades de ATP intracelular podem ser liberadas a partir de células lesadas (Chow et al., 1997; Agteresch et al., 1999), sendo este um importante mecanismo de resposta para condições que levam à lise celular. Por exemplo, em caso da resposta dos astrócitos ao dano celular do SNC (Neary et al., 1996).

Várias respostas biológicas foram documentadas para o ATP extracelular na maioria dos órgãos e tecidos até agora estudados (Dubyak e El-Moatassim, 1993). Alguns estudos demonstraram que o ATP pode estimular a mitogênese em células de mamíferos pelo envolvimento em diferentes cascatas de sinalização (Wang et al., 1991; Boarder e Hourani, 1998) (Figura 3). O ATP extracelular estimula a proliferação endotelial, do músculo liso, de fibroblastos, macrófagos e células tumorais (Greenberg et al., 1988; Van Daele et al., 1992; Malam-Souley et al., 1993).

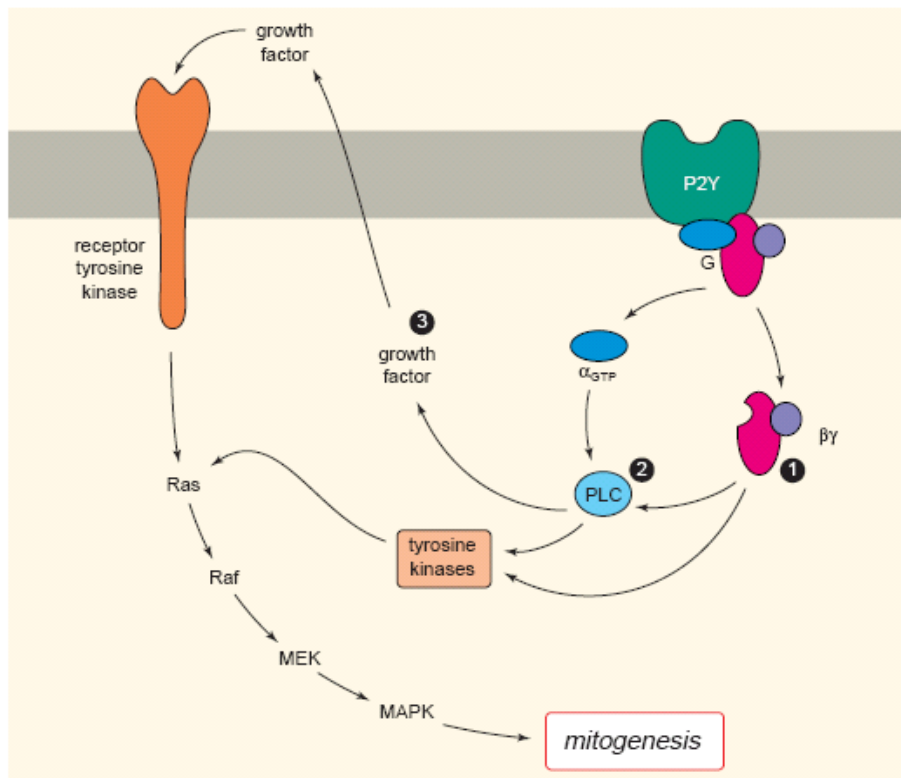


Figura 3. O controle da mitogênese pela MAPK via receptor P2Y. São ilustradas três vias a partir de um receptor P2Y para a ativação das vias da MAPK, e, portanto da mitogênese. Primeira via é independente de fosfolipase C (PLC), com ativação direta de um receptor não tirosina quinase pela subunidade $\beta\gamma$ da proteína G dissociada (1). Segunda via indica eventos dependentes de PLC (e.g. Ca^{2+} e PKC dependentes) ativando tirosina quinase (2). Terceira via é dependente da formação de fator de crescimento regulado pelo P2Y, o qual atua via o compartimento extracelular, para ativar um receptor tirosina quinase e consequentemente a cascata Ras-MAPK (3).

Adaptado de Boarder e Hourani (1998).

Em astrócitos, as purinas exercem diferentes efeitos via receptores purinérgicos (Cicarelli et al., 2001) (Figura 4). De um modo geral, os nucleotídeos da adenina estimulam, tanto a proliferação como a diferenciação em astrócitos (Abbracchio et al., 1994; Ciccarelli et al., 1994). O ATP induz à proliferação em culturas de astrócitos de ratos via receptores P2Y, e também aumenta sinergisticamente a proliferação induzida por FGF-2 em culturas de astrócitos (Neary et al., 1994). Os efeitos na proliferação induzidos em astrócitos pela ativação dos receptores P2 pelo ATP são bem caracterizados. Os análogos hidrolisáveis do ATP (ADP, AMP e adenosina) e análogos resistentes à hidrólise aumentam a taxa de proliferação em culturas de astrócitos (Abbracchio et al., 1994; Ciccarelli et al., 1994). Este efeito é inibido pela suramina, um antagonista não seletivo para P2, ou pelo RB2, um antagonista de receptor P2Y mais seletivo (Cicarelli et al., 1995).

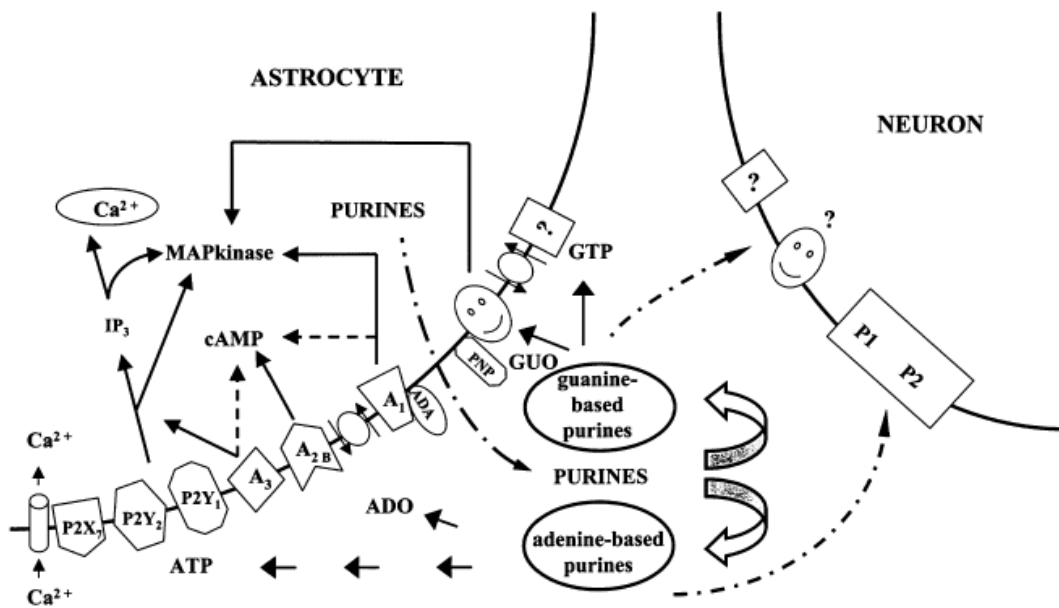


Figura 4. Representação esquemática dos receptores purinérgicos expressos por astrócitos e das principais vias de transdução ativadas (linhas preenchidas) ou inibidas (linhas pontilhadas) pela estimulação destes receptores. ‘?’ refere-se a possível existência de receptores purinérgicos da guanina. Uma vez liberados a partir dos astrócitos (linha pontilhada e tracejada) as purinas podem interagir com os respectivos receptores nos astrócitos ou em neurônios, exercendo efeitos tróficos. Adaptado de Ciccarelli e colaboradores (2001).

1.2.3 ADENOSINA E SUAS FUNÇÕES

A adenosina é um nucleosídeo endógeno com efeitos neuromodulatórios em muitas áreas do SNC de mamíferos, estando também envolvida na regulação da circulação sanguínea cerebral (Fredholm, 1995).

A função da adenosina como uma molécula sinalizadora extracelular, foi primeiramente estabelecida através de um estudo no qual foi demonstrado que este nucleosídeo é um potente agente inotrópico negativo e um vasodilatador coronariano (Drury e Szent-Györgyi, 1929). Posteriormente, foi demonstrado que ocorre a formação da adenosina extracelular em situações de hipóxia e isquemia cardíaca, propondo-se assim que a adenosina possui uma função protetora no coração (Ralevic e Burnstock, 1998). Subseqüentemente, obtiveram-se mais evidências para as ações protetoras da adenosina extracelular em outras células e sistemas orgânicos, incluindo o cérebro, rins, músculo esquelético e tecido adiposo. Com base nestas evidências, foi formulada por Newby (1984) uma hipótese unificadora para as ações da adenosina, e foi designado o termo ‘metabólito retaliatório’. Esta hipótese sugere que a adenosina, liberada em resposta a uma grande quantidade de estímulos de estresse, medeia um *loop* autorregulatório que tem a função de proteger os órgãos da lesão que se segue ao estímulo de estresse inicial.

As ações fisiológicas da adenosina resultam quase que exclusivamente da ocupação dos receptores de superfície e pela ativação de vias de sinalização intracelular. Uma vez que a adenosina atinge altas concentrações dentro da célula, ela é desviada para o espaço extracelular através de transportadores de nucleosídeos (Pastor-Anglada et al., 2001; Haskó e Cronstein, 2004) (Figura 5). Os receptores A₁ e A_{2a} são ativados por concentrações de adenosina na faixa de nanomolar, já os subtipos A_{2b} e A₃ tornam-se ativos somente quando

os níveis extracelulares de adenosina se elevam na faixa de micromolar durante períodos de inflamação, hipóxia ou isquemia (Baraldi e Borea, 2000; Olah e Stiles, 1995).

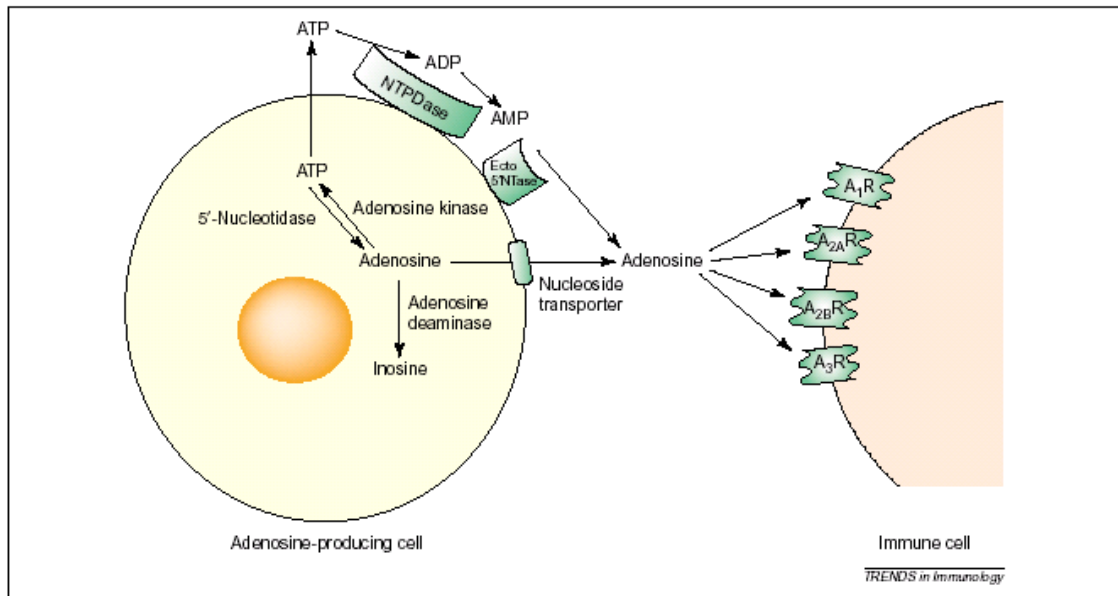


Figure 5. As maiores vias envolvidas no metabolismo da adenosina. Adenosina é formada a partir do precursor ATP nos espaços intra e extracelulares. A adenosina intracelular é desviada para o espaço extracelular através de transportadores de nucleosídeos localizados na membrana. A enzima da via de salvamento, adenosina quinase, refosforila a adenosina a ATP, enquanto que a adenosina desaminase metaboliza a adenosina a inosina. A formação extracelular de adenosina é o resultado de uma cascata enzimática que consiste de E-NTPDases e ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'NT).

Adaptado de Haskó e Cronstein (2004).

Os receptores A_1 têm uma ampla distribuição no cérebro, com alta densidade pré e pós-sináptica nos neurônios e nas células gliais no hipocampo, cerebelo e em baixa densidade no estriado (Fastbom et al., 1987). Os efeitos neuroprotetores da adenosina são mediados pela ativação do receptor A_1 , relacionado predominantemente pelo bloqueio pré-sináptico do influxo de Ca^{2+} que resulta na diminuição da inibição da liberação do

glutamato e na redução dos seus efeitos excitotóxicos em nível pós-sináptico (Abbracchio e Cattabeni, 1999).

Os receptores A_{2a} estão localizados na musculatura lisa e nas células endoteliais, nas plaquetas e neutrófilos e nos neurônios preferentemente na região do estriado (Ongini e Fredholm, 1996). Já os receptores A_{2b} são encontrados em pequenas quantidades na maioria das células do SNC, incluindo os astrócitos (Sebastião e Ribeiro, 1996).

Os receptores A_3 encontram-se em pequenas quantidades no cérebro e nos macrófagos (McWhinney et al., 1996). Previamente, foi demonstrado que a ativação do receptor A_3 da adenosina resulta em efeitos neuroprotetores e neurodegenerativos, dependendo das condições fisiopatológicas específicas. Este duplo efeito pode depender de mecanismos de regulação do receptor que são capazes de mudar a disponibilidade e/ou função do receptor, como também suas ligações a cascatas de transdução ou expressão de fatores celulares específicos (Liang e Jacobson, 1998). Um estudo realizado com células de astrocitomas demonstrou que ocorre a dessensibilização e internalização dos receptores A_3 após curta e longa exposição a agonistas (Trincavelli et al., 2002).

Além das suas ações diretas pré e pós-sinápticas neuronais, a adenosina também apresenta ações na regulação de vários neurotransmissores e neuromoduladores, através da ‘sincronização’ ou ‘dessincronização’ da ativação de receptores para neuropeptídeos, receptores nicotínicos autofacilitatórios da acetilcolina, receptores NMDA⁴, receptores metabotrópicos de glutamato, bem como aos próprios receptores de adenosina (Sebastião e Ribeiro, 2000).

Os efeitos da adenosina na proliferação celular são menos definidos. A adenosina tem sido mostrada por estimular a proliferação endotelial, neuroblastoma e células 3T3 de

⁴ Refere-se a N-metil-D-aspartato.

fibroblastos de camundongos, mas também inibe a proliferação de fibroblastos (Meininger et al., 1988; Meininger e Granger, 1990; Ethier, 1993).

1.3 AS ECTO-NUCLEOTIDASES

Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas que estão localizadas na superfície celular, podendo também estar presentes no meio intersticial ou nos fluidos corporais, denominadas ecto-nucleotidases (Zimmermann, 1996). Existem muitas evidências de que ao menos algumas destas enzimas localizadas na superfície celular têm também um papel importante na interação célula-célula, na diferenciação de neurônios e nos mecanismos de reparo após lesão neuronal. Várias destas ecto-enzimas são reguladas durante uma lesão no sistema nervoso, como por exemplo, após uma isquemia cerebral (Zimmermann, 2001).

A Figura 6 mostra as vias de degradação dos nucleotídeos na fenda sináptica durante o processo de neurotransmissão. O ATP extracelular pode ser rapidamente metabolizado por ecto-nucleotidases as quais têm um importante papel na regulação das respostas mediadas pelos purinoreceptores. A desfosforilação seqüencial e completa do ATP produzindo adenosina ocorre pela ação conjunta das ecto-nucleotidases (E-NTPDases) as quais geram AMP o qual pode ser hidrolisado pela ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'NT, CD73). A adenosina assim formada pode, por sua vez, ativar os receptores P1 levando a um *feedback* inibitório na liberação do ATP, que pode acarretar um aumento na ativação dos canais de K_{ATP} (Williams e Jarvis 2000).

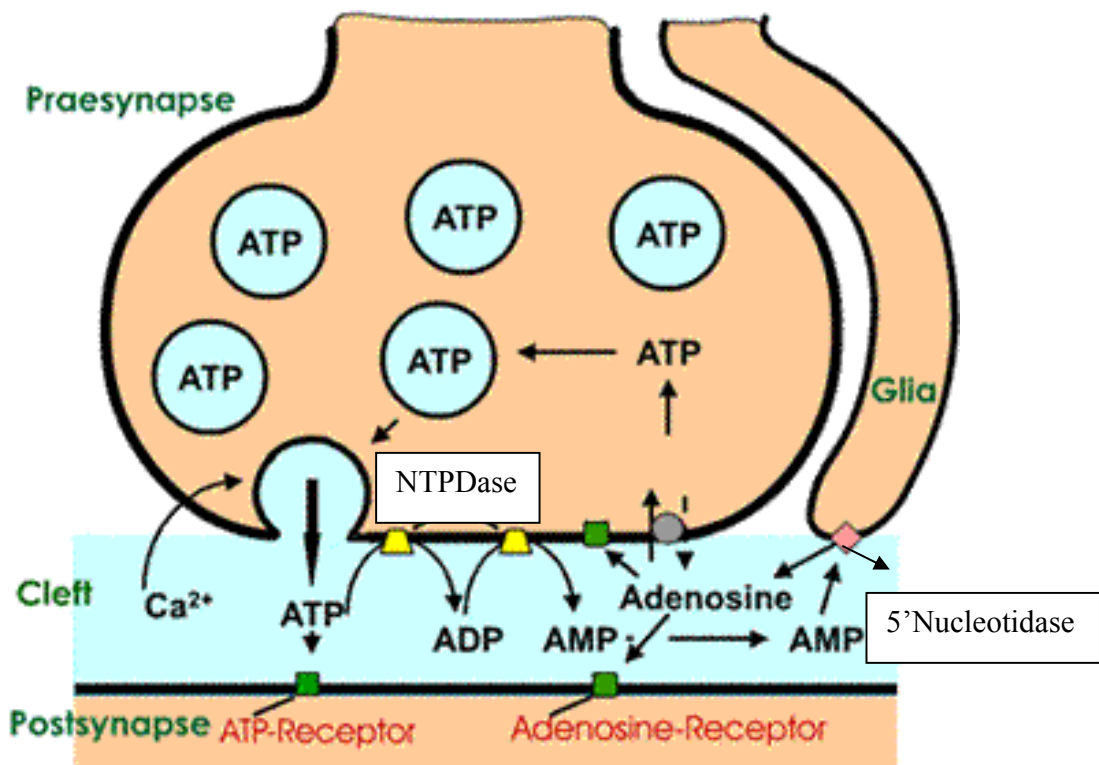


Figura 6. Vias de degradação dos nucleotídeos. O ATP é metabolizado rapidamente por uma família de ecto-NTPDases extracelulares para formar ADP que interage com receptores P2, e que por sua vez pode ser hidrolisado gerando AMP. O AMP dá origem à adenosina, que pode interagir com vários receptores P1.

Adaptado de www.bio.uni-frankfurt.de/zoologie/nch/nuclpage.htm.

Os nucleosídeos 5'-tri e-difosfatados podem ser hidrolisados pelos membros da família das E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), pela FAL (fosfatase alcalina) e pela família das E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase) (Zimmermann, 1999; 2001) (Figura 7).

As E-NPPs também possuem uma ampla distribuição tecidual e incluem os antígenos de diferenciação celular NPP1, NPP2 (PD-I α , autotaxina) e NPP3 (PD-I β , B10,

gp130RB13-6). Todos os membros desta família são ligados à membrana por um único domínio transmembrana N-terminal e apresentam um domínio para clivagem proteolítica, sugerindo sua ocorrência como enzimas solúveis (Zimmermann, 1999; 2001) (Figura 7).

Os nucleosídeos-5'-monofosfato são suscetíveis à hidrólise pela ação da ecto-5'-NT e por 5'-NT citosólicas, mas também pela FAL e por alguns membros da família das E-NPP (Battastini et al., 1991, 1995; Zimmermann, 2001) (Figura 7). A ecto5'-NT reside largamente na glia (astrócitos, oligodendrócitos e microglia). Esta enzima converte AMP em adenosina e Pi e é fortemente inibida por ATP e ADP (Zimmermann, 1992).

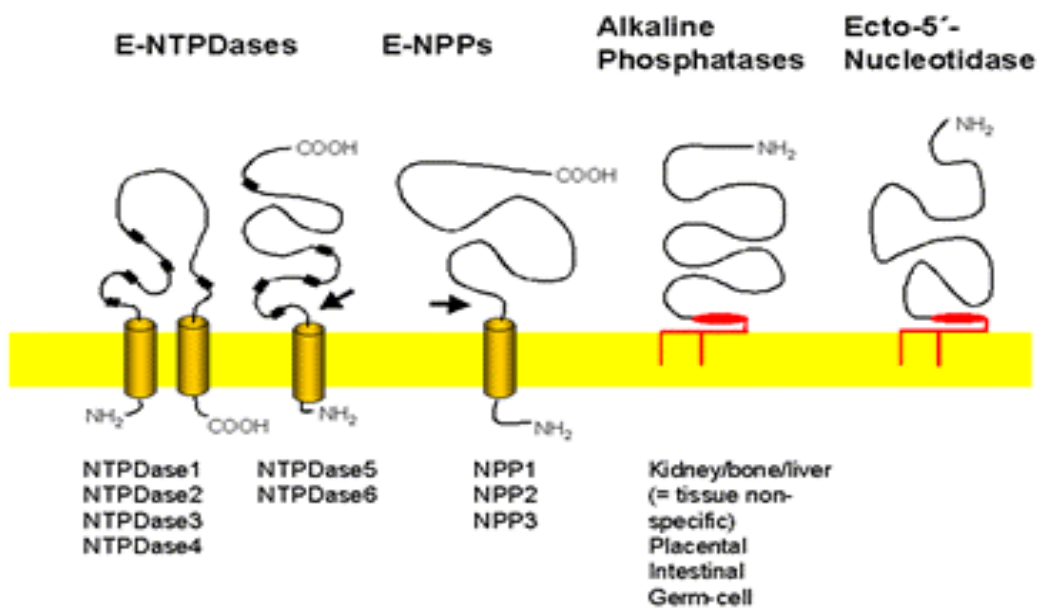


Figura 7. Topografia de membrana das ecto-nucleotidases. As NTPDases de 1 a 4 são ligadas à membrana plasmática por dois domínios transmembrana, N e C-terminal. NTPDase 5 e NTPDase 6 não possuem o domínio transmembrana C-terminal e podem ser clivadas ao próprio domínio N-terminal para formar uma proteína solúvel liberada (seta). As NTPDases de 4 a 6 são localizadas intracelularmente. Os quadros escuros na seqüência das E-NTPDase 1 a 6 representam as regiões conservadas das apirases (ACRs).

Adaptado de Zimmermann (2001).

1.3.1 A FAMÍLIA E-NTPDase

As ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDase) são descritas como a família de enzimas de mamíferos que cataliza a hidrólise dos γ - e β -resíduos de fosfato dos nucleotídeos, apresentando diferentes preferências pelos substratos (Zimmermann, 2001).

Até o momento foram clonados e funcionalmente caracterizados oito membros da família. Conforme demonstrado na Tabela 3, as NTPDases, classificadas de 1 a 8, no passado foram designadas com vários nomes aqui descritos entre parênteses: NTPDase 1 (CD39, ATPDase, ecto-apirase), NTPDase 2 (CD39L1, ecto-ATPase), NTPDase 3 (CD39L3, HB6), NTPDase 4 (UDPase, LALP70), NTPDase 5 (CD39L4, ER-UDPase, PCPH) e NTPDase 6 (CD39L2). Recentemente, foram clonados outros dois membros: NTPDase 7 (LALP1) e NTPDase 8 (Zimmermann, 2001; Bigonnesse, 2004).

Essa família de genes também tem membros em invertebrados, plantas, fungos e protozoários. As enzimas em mamíferos hidrolisam nucleosídeos di e trifosfatados, com diferenças consideráveis na preferência pelos substratos. Os sítios catalíticos estão voltados para o meio extracelular ou para o lúmen das organelas intracelulares, como Golgi e retículo endoplasmático. Os membros individuais podem diferir na seqüência de aminoácidos, porém todos compartilham as cinco regiões conservadas (ACRs), sendo essa uma marca característica dessa família (Zimmermann, 2001).

Estas enzimas requerem cátions divalentes (Ca^{2+} e/ou Mg^{2+}) para que ocorra a sua plena atividade enzimática. A presumível função das NTPDases ligadas a membrana plasmática, mais especificamente NTPDase 1-3 e NTPDase 8, é regular a concentração de nucleotídeos extracelulares e, portanto modular os seus efeitos biológicos exercidos pela ativação de vários receptores P2Y e P2X (Kukulski et al., 2004). Enquanto todos os

membros da família catalisam a hidrólise de ambos, nucleosídeos trifosfatados (NTP) e nucleosídeos difosfatados (NDP), as razões de hidrólise (NTP: NDP), variam significativamente para essas reações, resultando em enzimas que hidrolisam preferencialmente NTPs (NTPDase 2), preferencialmente NDPs (NTPDase 5 e 6) ou ambos nucleotídeos (NTPDase 1, 3 e 8) (Zimmermann, 2001; Grinthal e Guidotti, 2002).

A NTPDase 1 (CD39) hidrolisa ATP e ADP com aproximadamente a mesma velocidade (Wang e Gudotti, 1996; Sévigny et al., 1997; Heine et al., 1999). Ela é um componente chave na habilidade de bloquear a agregação plaquetária no endotélio vascular por controlar os níveis de ADP do sangue (Marcus et al., 1997; Enjyoji et al., 1999; Pinsky et al., 2002). Interessantemente, a atividade da NTPDase 1 é também necessária para manter a função das plaquetas por prevenir a dessensibilização do receptor P2Y₁ receptor na sua superfície (Enjyoji et al., 1999). Recentemente, foi demonstrada a expressão da NTPDase 1 nas células de Langerhans, onde tem uma função complexa na imunidade e inflamação (Mizumoto et al., 2002). Além disso, a atividade NTPDase 1 na microglia pode influenciar a sinalização de nucleotídeos entre neurônios ou astrócitos (Zimmermann, 2001).

A NTPDase 2 demonstrou uma função diversa da NTPDase 1 *in vitro*. A primeira facilita a agregação plaquetária por gerar ADP na presença do ATP (Sévigny et al., 2002), enquanto que a segunda hidrolisa na mesma razão ATP e ADP (Mateo et al., 1999). A NTPDase 2 hidrolisa ATP e ADP em uma razão de 30:1 (Heine et al., 1999; Mateo et al., 1999; Vlajkovic et al., 1999).

Ainda muito pouco se sabe a respeito do papel fisiológico da NTPDase 3. Esta é considerada um intermediário funcional entre a NTPDase 1 e a NTPDase 2, por hidrolisar o ATP e ADP numa razão de 3:1. Esta enzima hidrolisa mais rapidamente os nucleotídeos tri-

fosfatados em relação aos di-fosfatados, representando uma forma diferenciada de controle de tempo de permanência dos nucleotídeos no meio extracelular (Smith e Kirley, 1998; Zimmermann, 2001).

A NTPDase 4 possui estrutura semelhante às outras NTPDases já descritas. Existem duas formas humanas desta enzima: uma NTPDase 4 β (UDPase) está presente no lumen do aparelho de Golgi de células de mamíferos, onde proteínas e lipídeos são glicosilados (Brandan e Fleischer, 1982; Fleischer, et al., 1993; Wang e Guidotti, 1998) e outra forma presente em vacúolos lisossomais/ autofágicos (LALP70, NTPDase 4 α) (Biederbick et al., 1999). Ambas as enzimas hidrolisam nucleosídeos 5'-di e trifosfatos, mas ATP e ADP são hidrolisados com baixa preferência por estas enzimas (Biederbick et al., 1999).

A NTPDase 5 (CD39L4) e a NTPDase 6 (CD39L2) também podem ser encontradas na membrana plasmática e secretadas após a clivagem proteolítica (Yeung et al., 2000). A CD39L4 é uma NTPDase humana secretada, especificamente para a hidrólise de nucleosídeos difosfato (Mulero et al., 1999). Posteriormente, foi demonstrada a identidade funcional e estrutural entre a CD39L4 e o proto oncogene PCPH (Paez et al., 2001).

Outro membro encontrado recentemente e chamado LALP1 foi identificado como a NTPDase 7 (Shi et al., 2001). Esta enzima é considerada uma endoapirase com 88% de similaridade na seqüência de aminoácidos em humanos e camundongos. Estes genes compartilham consideráveis homologias com a hLALP70 (endoapirase lisossomal de mamíferos). A localização subcelular e a atividade enzimática da LALP1 indicam que esta enzima é realmente uma endoapirase com preferência de substrato para os nucleosídeos trifosfatados UTP, GTP, e CTP (Shi et al., 2001).

Recentemente, foi identificada e caracterizada uma nova NTPDase ligada à membrana plasmática com propriedades bioquímicas distintas, denominada NTPDase 8. A

seqüência de aminoácidos revela oito locais de N-glicosilação e dois domínios transmembrana, cinco regiões conservadas de apirase e 20-50% de identidade dos aminoácidos com outras NTPDases de mamíferos. Estudos demonstraram que as células intactas e as células lisadas da COS-7 expressando NTPDase8 são capazes de hidrolisar agonistas de receptores P2 tais como, ATP, ADP, UTP, e UDP, mas não hidrolisam AMP. A hidrólise de nucleosídeos trifosfatados resultou em uma acumulação transitória do difosfonucleosídeo correspondente, sugerindo uma via alternativa para modular os níveis de nucleotídeos e conseqüentemente a ativação de receptores P2 (Bigonnesse et al., 2004).

Tabela 3. Nomenclatura e preferência de substrato para os membros da família E-NTPDase em vertebrados

Nome	Nomes previamente utilizados	Preferência de substrato
NTPDase1	CD39, ecto-ATP difosfohidrolase, ecto-apirase	ATP=ADP (1:1)*
NTPDase2	CD39L1, ecto-ATPase	ATP>>>>ADP (30:1)*
NTPDase3	CD39L3, HB6	ATP>ADP (3:1)*
NTPDase4	UDPase (hLALP70v), hLALP70	UDP>GDP,CDP
NTPDase5	CD39L4, ER-UDPase	UDP>GDP,IDP>>>ADP,CDP
NTPDase6	CD39L2	GDP>IDP>>UDP,CDP>>ADP
NTPDase7	LALP1	UTP, GTP, CTP
NTPDase8		ATP = ADP (2:1)*

* Razão de hidrólise NTP:NDP. As NTPDases de 1 a 3 hidrolisam todos os outros nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, similarmente ao ATP e ADP.

Adaptado de Zimmermann (2001).

1.3.2 A 5'-NUCLEOTIDASE

A enzima 5'-nucleotidase compreende um grupo de enzimas localizadas na membrana plasmática de células de mamíferos e também estão presentes na mitocôndria, microsossomos, aparelho de Golgi e citosol (Zimmermann, 1992). A ecto-enzima 5'-nucleotidase (ecto-5'NT) está ancorada na membrana plasmática por um glicopeptídeo C-terminal que contém glicosil-fosfatidil-inositol, podendo ser encontrada na maioria dos tecidos (Zimmerman, 1992; 2001).

A principal função da ecto-5'NT é a conversão dos nucleosídeos monofosfato (ex. 5'-AMP), aos quais as células geralmente são impermeáveis, aos seus respectivos nucleosídeos (ex. adenosina), que pode penetrar prontamente na maioria das células (Hasko' e Cronstein, 2004). Em linfócitos, a ecto-5'NT ("*limphocyte surface protein CD73*") representa um marcador de maturação para as células T e B e está ausente nas células imaturas (Airas et al., 1997). Estudos também demonstraram que a CD73, possui características de uma molécula de adesão (Airas et al., 1995).

No SNC, esta enzima encontra-se associada às células da glia, localizada na membrana plasmática de astrócitos, oligodendrócitos, microglia e astrocitomas (Zimmermann, 1996). Alguns estudos demonstraram que a atividade da ecto-5'NT encontra-se aumentada em astrócitos, células microgliais e em sinaptossomas de hipocampo após isquemia focal e reperfusão (Braun et al., 1995; Schetinger et al., 1998). Além disso, a ecto-5'NT pode estar transitoriamente expressa nas sinapses e na superfície dos neurônios durante o desenvolvimento sináptico (Braun at al., 1995; Maienschein e Zimmermann, 1996).

1.3.3 OS TUMORES E AS ECTO-NUCLEOTIDASES

O sistema purinérgico pode estar envolvido com o desenvolvimento tumoral em vários tipos de cânceres, entre eles, gliomas, melanoma, carcinoma epitelial intestinal (Morrone et al., 2003; Coutinho-Silva et al., 2005, White et al., 2005).

Vários estudos têm demonstrado que alterações nas nucleotidases podem estar relacionadas ao desenvolvimento de diferentes tumores. Em melanomas diferenciados de humanos, foi observado um aumento na expressão da ecto-apirase/CD39, sugerindo que esta proteína pode ser um marcador de diferenciação tumoral, por apresentar gradual diminuição com a progressão do tumor (Dzhandzhugazyan et al., 1998). Já em células de hepatomas humanos há um aumento da expressão das ecto-ATPases na presença de EGF (Knowles, 1988). Estudos demonstraram a identidade molecular entre a NTPDase 5 (CD39L4) e o proto-oncogene (PCPH), com indicações do envolvimento desta proteína no desenvolvimento neoplásico (Paez et al., 2001).

Alguns tumores como câncer de mama (Dao et al., 1980; Walia, 1995), câncer de cabeça e pescoço (Lal et al., 1989) e glioblastoma (Fenoglio et al., 1997) podem causar uma elevação na atividade sérica da 5'-NT. Esta enzima pode ser liberada para a corrente sanguínea a partir do tumor primário ou dos locais de metástases (Sunderman, 1990). A medida da atividade sérica da 5'-NT não é um bom marcador para o diagnóstico de tumores, uma vez que o aumento na atividade desta enzima parece ser um denominador comum em pacientes com câncer. Entretanto, este marcador pode ser útil no acompanhamento do tratamento e na detecção de recidiva da doença, pois após o tratamento responsivo ocorre uma diminuição na atividade da enzima, e isto é sugestivo de inatividade do tumor (Lal et al., 1989). Além disso, a superexpressão da 5'-nucleotidase I

(cN-I) tem sido relacionada com a resistência aos análogos pirimidínicos (Hunsucker et al., 2001).

Estudos *in vitro* em linhagens de gliomas demonstraram que estas células possuem atividades específicas de hidrólise do ATP e ADP muito baixas e uma alta atividade da enzima ecto-5'NT quando comparadas com astrócitos (Wink et al., 2003). Devido à ação da ecto-nucleotídeo pirofosfatase e ecto-5'NT, a adenosina foi identificada como o principal produto de degradação do ATP nesta linhagem celular (Grobber et al., 1999). Além disto, linhagens de gliomas humanos apresentam uma baixa expressão das enzimas da família das ecto-NTPDases (Wink et al., 2003).

Considerando que os gliomas que secretam glutamato proliferam melhor *in vivo* (Takano et al., 2001), possuem baixa atividade ATPásica (Wink et al., 2003) e proliferam pela ação do ATP em baixas concentrações (Morrone et al., 2003), a hipótese deste trabalho é que os gliomas liberando vários neurotransmissores, entre eles glutamato e ATP causariam citotoxicidade, que acarretaria na morte do tecido normal ao redor do tumor. Como as células dos gliomas possuem baixa capacidade de hidrolisar o ATP, este permaneceria acumulado ao redor do tumor, gerando os processos de gliose reativa, apoptose e necrose, ocasionando mais morte neuronal e conseqüentemente maior liberação de glutamato e ATP. Deste modo o tumor poderia proliferar e ocupar o espaço provocado pelo dano ocasionado pelo glutamato num processo de retroalimentação positiva.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Investigar os efeitos da degradação do ATP extracelular no crescimento dos gliomas.

Objetivos Específicos:

- Verificar o grau de citotoxicidade induzida pelo ATP extracelular em linhagens celulares de gliomas comparado com células neuronais normais (Capítulo 1).
- Estudar o envolvimento do ATP extracelular no crescimento de gliomas em modelo de implante de gliomas em SNC de ratos (Capítulo 2).
- Estudar a ação de células de gliomas transfectadas com a enzima NTPDase 2/CD39L1 no crescimento do tumor (Anexo do Capítulo 2).
- Avaliar a atividade de hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP no soro de ratos submetidos a um modelo de gliomas (Capítulo 3).

3 CAPÍTULOS – ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 CAPÍTULO 1

INCREASED RESISTANCE OF GLIOMA CELL LINES TO EXTRACELLULAR ATP CYTOTOXICITY

Artigo publicado na Journal of Neuro-Oncology

*Laboratory Investigation***Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity**

Fernanda B. Morrone^{1,3}, Ana Paula Horn¹, Joseli Stella¹, Fernando Spiller¹, João J.F. Sarkis¹, Christianne G. Salbego¹, Guido Lenz² and Ana Maria O. Battastini¹

¹Departamento de Bioquímica, ICBS; ²Departamento de Biofísica IB, UFRGS, ³Faculdade de Farmácia, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

Key words: caspases, cell death, cytotoxicity, extracellular ATP, glioma

Summary

Glioblastomas are the most common form of primary tumors of the central nervous system (CNS) and despite treatment, patients with these tumors have a very poor prognosis. ATP and other nucleotides and nucleosides are very important signaling molecule in physiological and pathological conditions in the CNS. ATP is degraded very slowly by gliomas when compared to astrocytes, potentially resulting in the accumulation of extracellular ATP around gliomas. Cell lysis caused by excitotoxic death or by tumor resection may liberate intracellular ATP, a known mitotic factor for glioma cells. The aim of this study is to examine the effects on cytotoxicity induced by extracellular ATP in U138-MG human glioma cell line and C6 rat glioma cell line compared to hippocampal organotypic cell cultures. The cytotoxicity of ATP (0.1, 0.5, 5 mM) was measured using propidium iodide and LDH assays. Caspases assay was performed to identify apoptotic cell death. Results showed that the glioma cells present resistance to death induced by ATP when compared with a normal tissue. High ATP concentrations (5 mM) induced cell death after 24 h in organotypic cell cultures but not in glioma cell lines. Our data indicate that ATP released in these situations can induce cell death of the normal tissue surrounding the tumor, potentially opening space to the fast growth and invasion of the tumor.

Introduction

ATP is an important signaling molecule in the peripheral and central nervous system in physiological and pathological conditions [1] and its effect on cells is mediated by metabotropic (P2Y) and ionotropic (P2X) receptors [2,3]. Ectonucleotidases exert a strict regulatory control, which maintains the extracellular concentration of purines and pyrimidines at very low levels in physiological conditions [4]. However, in some pathological conditions, large amounts of intracellular ATP can be released from damaged cells [5,6], which is part of an important response mechanism to cell lyses as is the case for astrocyte responses to injury in CNS, in which several P2Y receptors are involved [7].

On the other hand, high concentrations of extracellular ATP can induce cell death in different cell types, including tymphocytes, hepatocytes, microglial and myeloid cells [8–12]. In some cell types this cell death is by necrosis and in other cells is mainly a caspase-dependent apoptosis mediated by the opening of the P2X₇ channel by concentrations of ATP in the mM range or by lower concentrations of the specific agonist benzoylbenzoylATP (BzATP) [8]. Studies *in vivo* described that ATP neurotoxicity in the rat striatum is induced by P2 receptors [13] more specifically the subtype P2X₇ [8,14].

In addition, several studies have shown the involvement of ATP in neuronal death. The extra-

cellular ATP released from cerebellar granules neurons can cause excitotoxicity induced by high concentration of glutamate and apoptotic death induced by serum deprivation, which can be partially inhibited by P2 receptors antagonists [15,16]. In turn, in several neuronal populations excitotoxicity mediated by ionotropic glutamate receptors modulates the release of purines [17,18]. Moreover, in astrocytes cultures, ATP also stimulates calcium-dependent glutamate release [19].

Glioblastomas are the most common form of primary tumors of the brain [20] and despite treatment, patients with these tumors have a very poor prognosis [21]. Recently, studies from our laboratory have showed that ATP is degraded very slowly by gliomas when compared with astrocytes, potentially resulting in the accumulation of extracellular ATP around glioma tumors [22].

ATP can be liberated to the extracellular space by the excitotoxic death of the normal host cells and by the injury caused by tumor resection, which is the mainstay of initial therapy for gliomas [23]. Since in glioma cell lines nucleotides and nucleosides induce proliferation [24], and ATP can mediate death in dissociated primary cerebellar granule or striatal neurons and in hippocampal organotypic cultures [25], the aim of this study is to examine the degree of cytotoxicity induced by extracellular ATP on gliomas cell lines in comparison to normal tissue.

Materials and methods

Compounds

Propidium iodide, BzATP and ATP, and all other chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Ac-DEVD-AMC (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA) was obtained from Peptide Institute.

Cell culture

The U138-MG human glioma cell line and C6 rat glioma cell line were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Cells were grown in culture flasks in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) with 15 and 5% fetal calf serum (FCS) for U138 and C6 cell lines, respectively, and seeded in 24-well plates at densities of 5×10^3 – 1×10^4 cells/well in 500 μ l medium per well. Cells were treated with ATP or BzATP for 24 h and death was measured as described below.

Organotypic cell cultures

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared using the method described by Stoppini et al. [26]. Briefly, male Wistar rat pups (postnatal day 6–8) were decapitated, the brain removed and the hippocampi dissected out. Transverse sections of 400 μ m were cut with Mcllwain tissue chopper and separated in Hank's balanced salt solution (HBSS). Six slices were placed on a Millicell-CM culture insert (Millipore®). The inserts were placed inside six well plates (Cell culture Cluster, Costar®), each well contained one insert and 1 ml of culture medium. The plates were then placed in an incubator at 36 °C, with a 5% CO₂ enriched atmosphere. The culture medium consisted of MEM (50%), horse serum (25%) and HBSS (25%). This basic medium was supplemented with (mM, final concentration): glucose 36; glutamine 2; HEPES 25 and NaHCO₃ 4. Fungizone 1% and garamicine 36 μ l/100 ml were usually added to the medium. The pH was adjusted to 7.3 with NaOH and immediately after, the solution was filtered (Millex GS, Millipore®). Medium was changed every 3 days and experiments were normally performed after 14 days *in vitro*.

Treatment and propidium iodide assay

Experimental slices organotypic cultures and glioma cell lines were exposed to extracellular ATP (0.1, 0.5, 5 mM) and BzATP (0.1 mM) for different times up to 24 h in the simultaneous presence of propidium iodide (6.4 μ M for gliomas and 7.5 μ M for organotypic cultures). Control cultures were not treated with ATP or BzATP. Propidium iodide fluorescence was excited at 515–560 nm using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300) fitted with a standard rhodamine filter. Images were captured using a digital camera connected to the microscope and analyzed using Scion Image Software.

Caspase assay

To measure caspase activity, organotypic slices and glioma cell lines (U138 and C6 cells) were washed in PBS mg/ml: Na₂HPO₄ 0.0004, NaCl 0.008, KCl 0.0002, pH 7.4 and then lysed on iced PBS and Triton X-100 0.2%. The extract was centrifuged at 10,000 \times g for 5 min and supernatant was collected. For each reaction, 30 μ g of the sample was incubated with a reaction buffer containing g/ml: sacarose 0.1, CHAPS 0.001, BSA 0.0001 and Hepes-NaOH 0.024, pH 7.5. The substrate, Ac-DEVD-AMC (Peptide Institute), had a final concentration of 0.02 mM. Caspases 3 and 7 cleaves the substrate between D and AMC, releasing the fluorescent AMC, which can be quantified by fluorimetry, using an excitation wavelength of 370 nm and an emission wavelength of 460 nm. All measurements were corrected for protein concentration. The fluorescence intensity was calibrated with standard concentrations of AMC, and the Caspase-3/7 activity calculated from the slope of the recorder trace and expressed in picomols per minute per mg of protein.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity

Cell viability was evaluated by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH, EC1.1.1.27) according to the procedure of Whitaker [27]. Briefly, after 24 h treatment the cell culture medium was collected and incubated with substrate mixture and LDH activity was determined by enzymatic colorimetric reaction. For additional comparison and to establish the limits of the method some cells were freeze–thawed (F/T) to obtain the control of 100% of cell death. Absorption was measured at 490 nm.

Statistical analysis

All experiments were carried out at least three times in triplicate or quadruplicate, and means \pm SEM are presented. Data were analyzed by one-way analysis of variance – ANOVA, followed by Tukey–Kramer test and Dunnett test. *P* values <0.05 were taken to indicate statistical significance.

Results

In this study we investigated the effects of extracellular ATP in rat organotypic hippocampal slice cultures and glioma cell lines in different concentrations and times of treatment. High extracellular ATP concentrations induced an intensive cell death in organotypic slice cultures treated for 24 h. As shown in Figure 1, the propidium iodide incorporation was significantly higher in those cells treated with ATP at a concentration of 5 mM in comparison to control cells. The percentage of cell death was around 60% of the total area of the organotypic slices and the damage was prevalently observed in the CA1 area (data not shown).

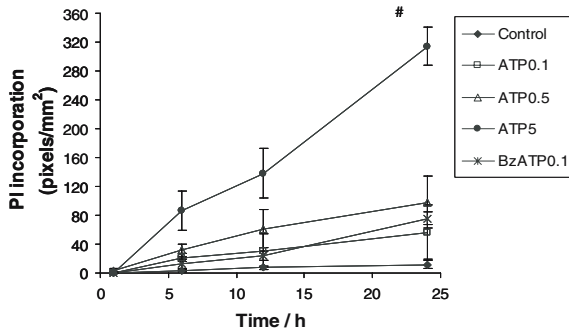


Figure 1. Effects of extracellular ATP on organotypic hippocampal slice cultures. Organotypic hippocampal cultures at 14 days were exposed to high extracellular ATP concentrations (0.1, 0.5, 5 mM) and BzATP (0.1 mM) for 24 h in the simultaneous presence of propidium iodide (7.5 μ M). Cellular death was analyzed by PI incorporation that was visualized using a Nikon inverted microscope. Data represents the means \pm SEM. # $P < 0.001$ as determined by ANOVA followed by Tukey–Kramer test.

It is well documented that ATP can induce cells death via apoptosis [9,28] and necrosis [29] and it seems that these effects can be mediated mainly *via* P2X₇ [5,11,14]. In order to examine if this receptor is involved in the death induced by ATP, we tested BzATP, a potent agonist of the P2X₇ receptor. BzATP, at a concentration of 0.1 mM, did not increase significantly propidium iodide incorporation in organotypic cultures after 24 h treatment (Figure 1).

In order to investigate whether glioma cells react differently to extracellular ATP, U138-MG human and C6 rat glioma cell lines were submitted to the same treatment as organotypic cultures. Figure 2 shows the

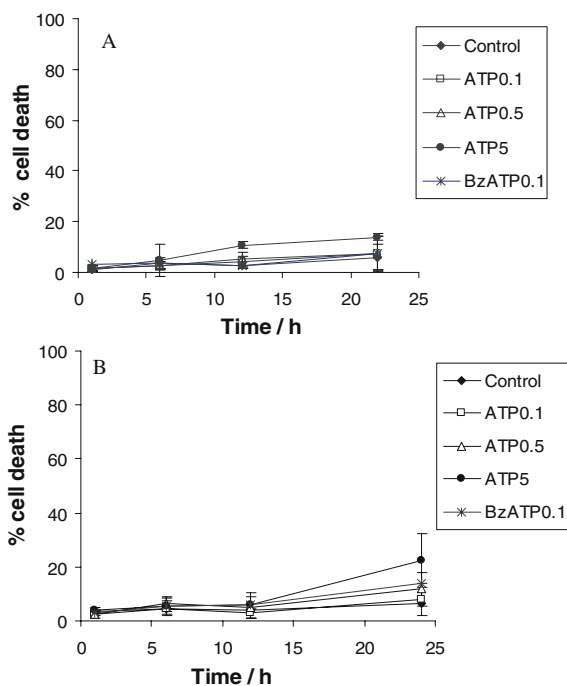


Figure 2. Effects of extracellular ATP on glioma cell lines. C6 rat cell line (A) and U138 human cell line (B) were treated as in Figure 1. Cell death is expressed by the percentage of positive cells for propidium iodide (6.4 μ M) in relation to the total number of cells. Data represents the means \pm SEM.

time-course of propidium iodide incorporation of glioma cell lines in culture incubated with ATP (0.1–5 mM) and the analogue BzATP (0.1 mM). On the contrary to organotypic cultures, glioma cell lines presented a clear resistance to cell death induced by extracellular ATP. Both cell lines were resistant to the treatments for 24 h, with a cell death that did not surpass 20% when compared with control samples.

The resistance to cell death presented by glioma cell lines to extracellular ATP was confirmed by measuring the release of LDH activity to the extracellular medium. As observed in Figure 3, the treatments with ATP (0.1–5 mM) and BzATP (0.1 mM) did not increase the LDH activity in the culture supernatants of both glioma cell lines after 24 h of treatment in relation to control cells. In agreement with the propidium iodide incorporation (Figure 2) these results show that the exposure of glioma cells to extracellular ATP causes an extracellular release of cytosolic LDH, which is about 20% of the total release induced by freeze–thaw of the cells.

Considering that cysteine–aspartate proteases (caspases) activity is a hallmark of apoptotic cell death [30], the organotypic cultures and glioma cells were treated with the ATP (5 mM) and BzATP (0.1 mM) for 24 h and caspases 3 and 7 assay was performed. There was a significant increase in caspases 3/7 activities after the treatment with 5 mM ATP in hippocampal organotypic cultures and a smaller activation in cultures treated with the analogue BzATP (Figure 4). The treatment with the same concentrations of ATP and BzATP, in rat glioma cell line C6 and human glioma U138, did not activate significantly

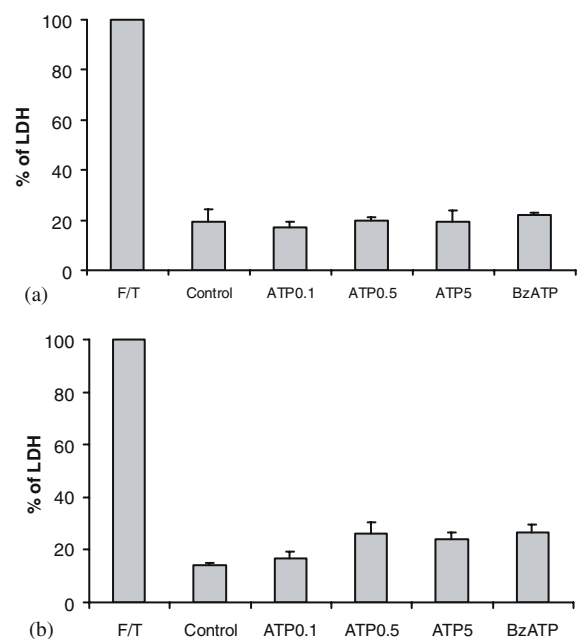


Figure 3. Lactic dehydrogenase (LDH) release. C6 (a) and U138 (b) cell death was quantified by measuring LDH release from damaged cells after 24 h treatment with ATP (at concentrations indicated) and Benzoyl-ATP (0.1 mM). For comparison, the cells were freeze–thawed (F/T) to obtain the control of 100% of cell death. Data represents means \pm SEM of normalized optical densities of three independent experiments.

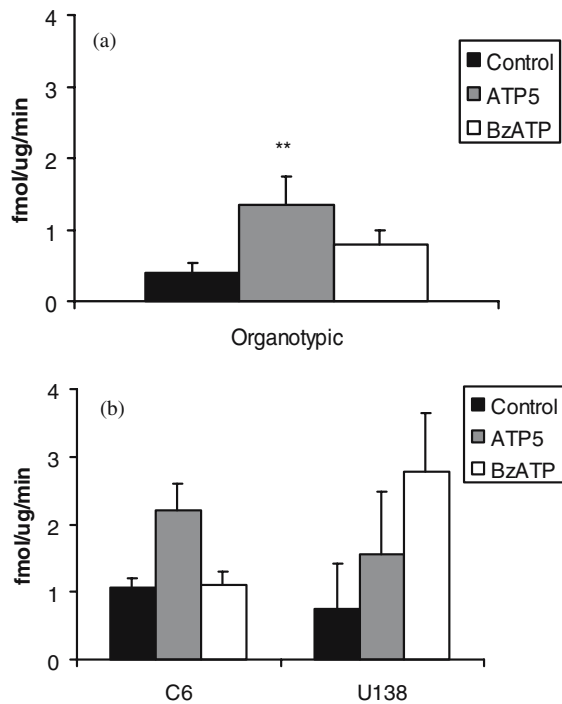


Figure 4. Caspases 3/7 activity in organotypic hippocampal slice cultures (a) and glioma cell lines (b). Cells were treated with ATP (5 mM) and BzATP (0.1 mM) for 24 h and caspases 3/7 activities were determined by fluorescence intensity examination. Data represents the means \pm SEM. ** $P < 0.01$ as determined by ANOVA followed by Dunnett test.

caspases 3/7 (Figure 4), confirming the resistance to gliomas to extracellular ATP-induced apoptotic cell death.

Discussion

Here we have studied the effect of high extracellular ATP concentrations in two glioma cell lines (U138-MG and C6) and compared to rat organotypic hippocampal slice cultures. As detected by propidium iodide incorporation, glioma cells presented resistance to death induced by ATP at different concentrations, while exposure of organotypic cultures for 24 h to extracellular ATP induced cell death of around 60%, confirming, in this way, the sensitivity to ATP-evoked toxicity previously reported in normal neuronal tissue [25].

In the present work, we also observed that in organotypic cultures, the cytotoxic effect of P2X₇ analogue BzATP was smaller than that induced by ATP suggesting the involvement of receptors other than P2X₇ in the neuronal death evoked by extracellular ATP, as suggested by Amadio et al. [25].

The main finding of the present study is that the cell death induced by high concentrations of extracellular ATP found in organotypic cultures was not observed in the two gliomas cell lines (Figure 2). Solid tumor such as a glioma normally present clonal origin with an early loss or mutation of genes such as p53 and PTEN found in all cells of a tumor, with some variability due to its chromosomal instability [31,32]. Cell lines have

similar mutations, and the process of growing the cell in culture probably adds some variability. This similarity makes cancer cell lines a good model for several aspects of cancer biology [33]. Therefore, the progression of a tumor is a process which involves the growth of one cell type, mimicked by the cell line, against a tissue, mimicked here by the organotypic culture, a widely used preparation which reproduces several pathophysiological properties of the neural tissue [25,26,31].

ATP is known to be released in the extracellular milieu of the CNS, both in physiological and pathological conditions [5,6,25,34]. The two main mechanisms that can liberate ATP to the extracellular space around the brain tumors are the excitotoxic death of the normal host cells, and the injury caused by the surgical tumor resection. Considering the internal concentration of ATP, which is from 5 to 10 mM in most cells [8], cell death potentially elevates the extracellular concentration of ATP to millimolar levels, similar to the concentration that induced cell death in organotypic cultures. We recently showed that different glioma cell lines have low rates of extracellular ATP hydrolysis [22] in contrary to astrocytes, and the astrocytic resistance to cell death induced by ATP could be due to, at least in part, its high rate of ATP hydrolysis in physiological conditions.

In the gliomas, because of its low rate of ATP hydrolysis, the resistance to ATP-induced death has to be at the level or downstream of purinergic receptors. One candidate of this downstream effect could be PTEN, which is deleted in a large fraction of gliomas, including the gliomas used in the present work, and which dephosphorylates phosphatidylinositol phosphates, reverting the effect of PI3K activation and leading to a suppression of the well established anti-apoptotic PI3K/Akt pathway [35]. A smaller activation of caspase activities seen in gliomas when compared to organotypic cultures indicates that the former presents resistant mechanism to ATP-induced apoptosis, not present in the latter.

Accordingly, it is well known that glutamate excitotoxicity is involved in numerous CNS disorders, and glutamate secreting glioma cells have a significant growth advantage [36,37]. Glutamate can induce ATP release from astrocytes [38] and in neuronal population excitotoxicity mediated by ionotropic glutamate receptors can modulate purine release [18], producing a positive feedback able to burst the tumor growth.

Considering that glioblastomas induce necrosis and consequent gliosis-like features [23] and that the current therapeutical strategies for gliomas are also strong gliosis inducers [23,39], it is reasonable to propose that the increased concentration of ATP in gliotic lesions could promote glioma proliferation and invasion by both inducing proliferation of the glioma cells [24] as well as opening space due to the death of healthy tissue that comes into contact with the glioma. A very important part of this process is the immunity of gliomas to the toxicity of ATP, as shown here. It is important to emphasize the positive feedback nature of this process, which could be responsible, at least in

part, for the fast growth and invasion usually presented by glioma tumors.

In conclusion, our study shows that glioma cells presented a clear resistance to death induced by cytotoxic concentrations of ATP when compared with normal brain tissue. Taken together with their inability to metabolize extracellular ATP, it seems probable that we identified a novel and important mechanism associated with malignance of these tumors. The inhibition of ATP release by gliomas or the blockade of ATP receptors will serve as an alternative strategy in the management of patients with malignant gliomas.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian agencies: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). We are grateful to Dr. Fabiana Horn and Michele Bastiani for the help with the caspase assay.

References

- Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413–492, 1998
- Zimmermann H: Signalling via ATP in the nervous system. *TiNS* 17: 420–426, 1994
- Burnstock G, Wood JN: Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol* 6: 526–532, 1996
- Zimmermann H, Braun N: Ecto-nucleotidases molecular structures, catalytic properties, and functional roles in nervous system. *Prog Brain Res* 120: 371–385, 1999
- Chow SC, Kass GEN, Orrenius S: Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacology* 36: 1149–1156, 1997
- Agteresch HJ, Dagnelie PC, Van Den Berg JW, Wilson JH: Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 58: 211–232, 1999
- Neary JT, Rathbone MP, Cattedeni F, Abbraccio MP, Burnstock G: Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *TiNS* 19: 13–18, 1996
- Di Virgilio F: Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *J Auton Nerv Syst* 81: 59–63, 2000
- Chvatchko Y, Valera S, Aubry JP, Renno T, Buell G, Bonnefoy JY: The involvement of an ATP-gated ion channel, P2X₁, in thymocyte apoptosis. *Immunity* 5: 275–283, 1996
- Tinton SA, Lefebvre VH, Cousin OC, Buc-Calderon PM: Cytolytic effects and biochemical changes induced by extracellular ATP to isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1176: 1–6, 1993
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Susino M, Collo G, Buell G, Di Virgilio F: ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. *Neuropharmacology* 36: 1295–1301, 1997
- Ferrari D, Los M, Bauer MKA, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K: P2Z purinoceptors ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* 447: 71–75, 1999
- Ryu JK, Schin WH, Kim J: ATP-induced *in vivo* neurotoxicity in the rat striatum via P2 receptors. *Neuroreport* 13: 1611–1615, 2002
- Dubyak GR, El-Moatassim C: Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and nucleotides. *Am J Physiol* 265: C577–C606, 1993
- Volonté C, Merlo D: Selected P2 receptor modulators prevent glutamate-evoked cytotoxicity in culture cerebellar granule neurones. *J Neurosci Res* 45: 183–193, 1996
- Volonté C, Ciotti MT, D'Ambrosi N, Lockhart B, Spedding M: Neuroprotective effects of modulators of P2 receptors in primary culture of CNS neurones. *Neuropharmacology* 38: 1335–1342, 1999
- Robertson SJ, Edwards FA: ATP and glutamate are released from separate neurons in the rat medial habenula nucleus: frequency dependence and adenosine mediated inhibition of release. *J Physiol* 508: 691–701, 1998
- Bennet GC, Boarder MR: The effect of nucleotides and adenosine on stimulus evoked glutamate from rat brain cortical slice. *Br J Pharmacol* 131: 617–623, 2000
- Jeremic A, Jeftinija K, Stevanovic J, Glavaski A, Jeftinija S: ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. *J Neurochem* 77: 664–675, 2001
- Collins VP: Cellular mechanisms targeted during astrocytoma progression. *Cancer Lett* 188: 1–7, 2002
- Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, Isaacson S, Rotman M, Asbell SO, Nelson JS, Weinstein AS: Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26: 239–244, 1993
- Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartzmann G, Sarkis JJ, Battastini AMO: Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett* 198: 211–218, 2003
- Laws ER, Shaffrey Jr ME: The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. *Int J Neurosci* 17: 413–420, 1999
- Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, Bernardi A, Schwartzmann G, Rodnight R, Lenz G: Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurooncol* 64: 211–218, 2003
- Amadio S, D'Ambrosi N, Cavaliere F, Murra B, Sancesario G, Bernardi G, Burnstock G, Volonté C: P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacol* 42: 489–501, 2002
- Stoppini L, Buchs PA, Muller DA: A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Meth* 37: 173–182, 1991
- Whitaker JF: A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH-NAD⁺ system. *Clin Chim Acta* 24: 23–27, 1969
- Zanovello P, Bronte V, Rosato A, Pizzo P, Di Virgilio F: Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 11: 274–277, 1990
- Murgia M, Pizzo P, Steinberg TH, Di Virgilio F: Characterization of the cytotoxic effect of extracellular ATP in I774 mouse macrophages. *Biochem J* 288: 897–901, 1992
- Meller R, Skradski SL, Simon RP, Henshall DCM, Meller R, Skradski SL, Simon RP, Henshall DC: Expression, proteolysis and activation of caspases 6 and 7 during rat C6 glioma cell apoptosis. *Neurosci Lett* 10;324(1): 33–36, 2002
- Dong ZQ, Pang JCS, Tong CYK, Zhou LF, Keung H: Clonality of oligoastrocytomas. *Human Pathol* 33: 528–535, 2002
- Muller W, Lass U, Kuchelmeister K, Bergmann M, Deimlin A: Clonal analysis of glioblastoma with epithelial differentiation. *Brain Pathol* 11: 39–43, 2001
- Masters JR: Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 233–236, 2000
- Abbraccio MP, Burnstock G: Purinergic signaling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78: 113–145, 1998
- Holland EC: Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nature* 2: 120–129, 2001

36. Zu-Cheng Y, Sontheimer H: Glioma cells release excitotoxic concentration of glutamate. *Cancer Res* 59: 4383–4391, 1999
37. Takano T, Lin JHC, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M: Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med* 7: 1010–1015, 2001
38. Queiroz G, Meyer DK, Meyer A, Starke K, Von Kugelgen: A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors. *Neuroscience* 91: 1171–1181, 1999
39. Kureshi AS, Hofman FM, Schneider JH, Chin LS, Apuzzo ML, Hinton DR: Cytokine expression in radiation-induced delayed cerebral injury. *Neurosurgery* 35: 822–829, 1994

Address for offprints: Ana Maria O. Battastini, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90.035.003, Porto Alegre, RS, Brazil; Tel.: +55-51-3316-5554/+ 55-51-3316-5553; Fax: +55-51-3316-5535; E-mail: batas@terra.br

3.2 CAPÍTULO 2

**INVOLVEMENT OF EXTRACELLULAR ATP ON THE
GLIOBLASTOMA GROWTH IN A RAT GLIOMA MODEL**

Artigo submetido para publicação na Cell & Tissue Research.

**INVOLVEMENT OF EXTRACELLULAR ATP ON THE GLIOBLASTOMA
GROWTH IN A RAT GLIOMA MODEL**

Morrone FB^{1,4}, Oliveira DL¹, Gamermann PW¹, Stella J¹, Wofchuk S¹, Wink MR²,
Meurer L³, Edelweiss MIA³, Lenz G², Battastini AMO^{1*}

*¹Departamento de Bioquímica, ICBS, ²Departamento de Biofísica IB,
³Departamento de Patologia, HCPA, UFRGS, ⁴Faculdade de Farmácia, PUCRS,
Porto Alegre, RS, Brazil*

*Corresponding Author: Ana Maria O Battastini¹

e-mail: batas@terra.com.br

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS, Rua
Ramiro Barcelos 2600-Anexo,

90.035.003, Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: +55 (51) 3316.5554/ +55 (51) 3316.5553

FAX: +55 (51) 3316.5535

Abstract

ATP is an important signaling molecule on the peripheral and central nervous system (CNS). Both glioma growth and tumor resection induces cell death thus liberating nucleotides to the extracellular medium. Nucleotides are hydrolyzed very slowly by gliomas when compared with astrocytes and induce neuronal cell death and glioma proliferation. The objective of the present work was to test the involvement of extracellular ATP on glioblastoma growth in a rat glioma model. In order to deplete the extracellular ATP around gliomas, the enzyme apyrase was co-injected with gliomas implanted in the rats CNS. Our results showed that effectively C6 cells have a low expression of the all NTPDases investigated in comparison with normal astrocytes. The rats that suffered co-injection of apyrase had a significant reduction of the tumor size ($p < 0,05$) in comparison with the control groups. We also observed the reduction of the mitotic index as well as a smaller immunodetection of Ki67, vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD31 on the rats treated with apyrase. These results indicate that extracellular ATP can have effectively an important role on glioma expansion.

Key words: Extracelular ATP, tumor growth, glioma, apyrase

Introduction

Gliomas are a type of primary brain tumor that display an extensive invasive behavior, but do not metastasize. The growth and invasiveness into the surrounding normal brain tissue makes gliomas a major challenge for clinical intervention (Laws and Shaffrey 1999; Holland 2001; Grobbs et al. 2002). Therefore, the elucidation of the mechanisms involved in tumor growth, invasion and angiogenesis could aid in the treatment of these tumors.

The invasive cellular behavior of malignant gliomas is determined by receptor mediated cell-substratum contacts and cell-cell interaction, as well as cellular locomotion (Kaczarek et al. 1999). Clues to the invasion process have been ascertained through clarification of the key roles played by the extracellular matrix (ECM), cell-adhesion molecules and matrix degrading proteases (Chintala et al. 1999).

Among other elements, vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most prominent angiogenic growth factors. In fact, it has been shown that VEGF is secreted by the C6 rat glioma cell line (Plate et al. 1993). This growth factor is produced by almost all solid tumors and its receptors are highly expressed on vascular endothelial cells and, predominantly, in vessels in the proximity of the tumor (Schaper and Buschmann 1999). Moreover, some other systems may be involved in the growth and invasion of the gliomas. Glutamate secreting glioma cells demonstrate a growth advantage and glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate, thus killing neurons close to the tumor border and opening space for tumor growth (Ye and Sontheimer 1999; Takano et al. 2001, Eyupoglu et al. 2005).

Another important signaling molecule that may be involved in glioma development is ATP (Ralevic and Burnstock 1998). In glioma C6 cells, ATP can bind and activate P2Y2, whereas its degradation product, ADP, activate P2Y1 and P2Y12 receptors (Sabala et al. 2001; Czajkowski et al. 2002, 2004; Baranska et al. 2004).

In previous studies, we showed the involvement of the purinergic system in glioma proliferation in different cell types (Morrone et al. 2003) and that glioma cells present a clear resistance to death induced by cytotoxic concentrations of ATP when compared with normal brain tissue (Morrone et al. 2005). Taken together with its inability to metabolize extracellular ATP (Wink et al. 2003), the purinergic system may form part of a novel and important mechanism associated with the malignance of these tumors.

ATP may be liberated into the extracellular space by the excitotoxic death of the normal host cells and by the injury caused by tumor resection, which is the mainstay of initial therapy for gliomas (Neary et al. 2005). In glioma cell lines, nucleotides and nucleosides induce proliferation (Morrone et al. 2003), and ATP can mediate death in dissociated primary cerebellar granules or striatal neurons and in hippocampal organotypic cultures (Amadio et al. 2002). Thus, we hypothesize that ATP liberated under these conditions may, besides inducing proliferation of the glioma itself, induce the cell death of normal tissue and, consequently, increase the interstitial space around the malignant glioma. The indirect autocrine nature of this process should be noted; the tumor induces, through the death of normal cells, the release of more ATP that stimulates its own multiplication and, as a consequence, the cell death of other cells opening space to be occupied by tumor cells and liberating more ATP to continue the invasive process.

To test this hypothesis, we examined the effect of co-injection of apyrase, an ATP depleting enzyme, in a C6 rat glioma experimental model, which has been extensively used to test antitumoral interventions.

Material and methods

Cell culture

The C6 rat glioma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, U.S.A.). Cells were grown in culture flasks in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) with 5% fetal calf serum (FCS) (Cultilab, Brazil).

Glioma implantation

Rat C6 glioma cells at around 70% confluency were trypsinized, washed once in DMEM/15% serum, spun down and resuspended in DMEM. A total of one million cells in a volume of 3 μ l were injected at a depth of 6.0 mm in the right striata (coordinates with regard to bregma: 0.5 mm posterior and 3.0 mm lateral) of anesthetized male Wistar rats, 250-270 g (Takano et al. 2001). After 20 days, the rats were decapitated and the entire brain was removed, sectioned and fixed with 10% paraformaldehyde.

All the procedures were approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Treatment with temozolomide

Ten days post-implantation, the rats were treated with 5 mg/Kg/day (i.p.) of temozolomide or DMSO (control group of temozolomide) during 5 consecutive days. The drug was dissolved in DMSO at a final concentration of 10% (Patel et al. 2000).

Co-injection of apyrase with C6 cells

Just before the injection, an apyrase (VII grade) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) solution containing 2 U/ml was prepared in a C6 cell suspension in DMEM. The ATPase and ADPase activities of apyrase were measured as previously described (Wink et al., 2003); as expected, boiled apyrase did not present any activity. This preparation, containing C6 cells and apyrase, was injected in 3 μ l. An additional pulse of 3 μ l apyrase in DMEM was given within 1 min of the first injection. As a control group, apyrase was denatured by boiling for five minutes and was then injected together with a C6 cell suspension using the same protocol described above. The enzyme activity of the injected apyrase was controlled by measuring the hydrolysis of ATP and ADP in an incubation medium containing 50 mM Tris.HCl, pH 7.5 and 1.5 mM CaCl₂ and ATP or ADP as substrates to a final concentration of 1 mM, at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 0.2 ml of 10% TCA. The amount of inorganic phosphate liberated was measured by the malachite green method (Chan et al. 1986).

Pathological analysis and tumor volume quantification

At least three hematoxylin and eosin (H&E) sections (4 μ m thick, paraffin embedded) of each tumor were analyzed by two independent pathologists, blinded for the

experimental data. For tumor size quantification, images were captured using a digital camera connected to the microscope and analyzed using Image Tool Software™. The total volume (mm³) of the tumor was computed by summing the segmented areas and by the multiplication of the slice resolution.

Immunohistochemical stainings

Paraffin embedded, 5-mm formalin fixed tissue sections were mounted on microscope slides. Tissue sections were then dried overnight at 60 °C, dewaxed in xylene and rehydrated with distilled water. Endogenous peroxidase was inhibited by 1% H₂O₂ in methanol for 10 min. Incubation with the following antibodies was performed overnight at room temperature: anti-Ki67 (1:20) (Dako, USA) and anti-VEGF (1:400) (Dako, USA), followed by incubation with secondary antibody and Streptavidin-Avidin-Biotin (Kit Lsab, Dako, USA). The peroxidase reaction was performed using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), according to the manufacturer's specifications. Finally, sections were counterstained with Harris haematoxylin. Glioma cell proliferation was assessed by counting the percentage of Ki67 positive glioma cell nuclei in five independent high-magnification (x200) fields per animal. Sections of rat spleen were used as positive controls. To evaluate microvessel density, we used anti-CD31 mAb (BD PharMingen, USA). The glioma sample specimens were snap frozen in liquid nitrogen and cut into 4 µm sections. Frozen tissue was fixed in cold acetone (-20°C). Subsequently, serial sections were stained with anti-CD31 mAb (1:30). The reaction was developed as described above.

The number of positive vessels/microscopic field (x200) was counted. All samples were read blindly by two independent readers, and the mean of their scores is presented.

Real time PCR analysis

Total RNA from cortical rat astrocytes or C6 glioma cells was isolated from confluent cultures with RNA Mini Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA species were synthesized with SuperScript II (Life Technologies) from 5 µg of total RNA in a total volume of 20 µl with both oligo (dT) primer and random hexamers in accordance with the manufacturer's instructions. SYBR Green I-based real-time PCR was carried out using the MJ Research DNA Engine Opticon™ Continuous Fluorescence Detection System (MJ Research Inc., Waltham, MA), as described previously (Zerbini et al. 2003). All PCR mixtures contained: PCR buffer (final concentration: 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, and 0.1% Triton X-100), 250 µM deoxy-NTP (Roche), 0.5 µM of each PCR primer, 0.5x SYBR Green I (Molecular Probes), 5% DMSO, and 1U taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI) with 2 µl cDNA in a 25 µl final volume reaction mix. The samples were loaded into wells of Low Profile 96-well microplates. After an initial denaturation step for 1 min at 94°C, conditions for cycling were 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 56°C, 1 min at 72°C. The fluorescence signal was measured right after incubation for 5 sec at 79°C following the extension step, which eliminates possible primer dimer detection. At the end of the PCR cycles, a melting curve was generated to identify specificity of the PCR product. For each run, serial dilutions of human GAPDH plasmids were used as standards for quantitative measurement of the amount of amplified DNA. In addition, for normalization of each sample, hGAPDH

primers were used to measure the amount of hGAPDH cDNA. All samples were run in triplicate and the data were presented as a ratio of enzymes/GAPDH. The set of primers used for NTPDase1 (CD39), NTPDase2 (CD39L1), NTPDase3 (CD39L3), NTPDase5 (CD39L4) and NTPDase6 (CD39L2) were as described in Vollmayer et al. (2001). Oligonucleotides were obtained from Invitrogen. Negative controls were performed with water as template and positive controls were plasmids with cDNA sequences for mouse NTPDase1, rat NTPDase2, and human NTPDase3, NTPDase5 and NTPDase6.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance - ANOVA, followed by Tukey-Kramer test. *P* values < 0.05 were taken to indicate statistical significance and means \pm SEM are presented.

Results

In the present study we tested the effect of the apyrase enzyme on the growth of glioma cells *in vivo*. Since glutamate uptake is an important feature in the growth of gliomas (Takano et al. 2001), experiments were performed to determine [³H] glutamate uptake in these cells. The C6 gliomas used in this study were shown to have virtually no glutamate uptake when compared to astrocytes (data not shown).

We have previously shown that C6 gliomas, a cell line that was originated from N-nitrosomethylurea-treated rats, exhibited almost undetectable ATP and ADP-degrading activity; however, our results did not allow the identification of which NTPDase family members are expressed by these cells (Wink et al. 2003). To investigate which of the ecto-

NTPDases are present in the C6 glioma cell line, total RNA was isolated from cultured glioma cells and the cDNA was analyzed by Real Time-PCR with primers for the NTPDase family. Figure 1 shows that C6 cells effectively have a low expression of all NTPDases investigated, in comparison with normal astrocytes. We, therefore, chose the purified apyrase, which hydrolyzes ATP and ADP at a similar rate to test our hypothesis of the ATP participation in the process of glioma invasion in host brain.

The implanted tumors have characteristics that are closer to those of human glioblastomas with the C6 cells growing in the intracerebral, intraventricular and intraparenchymal spaces (data not shown). Haematoxylin and eosin examination showed that the implanted tumor has a high mitotic index, nuclear pleomorphism, foci of tumor necrosis, intratumoral hemorrhage and parenchymal invasion (Table 1). In some cases, pathological analysis identified palisading cells delineating the foci of necrosis and lymphocytic infiltration, with the occasional formation of edema fluid and neovascularization, which are characteristics of glioblastoma multiforme in humans (Table 1) (Fig. 4a and 4c).

In order to analyze whether the tumors implanted into host brain were responsive to drugs that are clinically used to treat gliomas and to validate our model, the rats were treated with the alkylating agent, temozolomide (Newlands et al. 2003). In fact, tumor size analysis showed that the rats treated with temozolomide presented a significant reduction in tumor size when compared with the control groups (Fig. 2). In addition, rats treated with temozolomide survive significantly longer than their respective controls, demonstrating a relative benefit of 100% in the rats' survival, that means, at the time that 100% of control animals died, all animals from the treated group were still alive (data not shown).

Confirming the purinergic hypothesis of glioma growth, the results presented in Figure 3 show that the rats with implanted glioma co-injected with apyrase had a significant reduction in the tumor size ($p < 0.05$) in comparison with the rats injected only with gliomas or with gliomas plus inactivated apyrase, indicating that it is not the presence of the polypeptide, but the enzymatic activity that is responsible for the effect of apyrase. Additionally, incubation of the cells in culture with apyrase did not affect glioma growth or survival, indicating that apyrase did not reduce the viability of the injected cells.

According to the pathological analysis, the malignant gliomas induced by C6 injection and co-injected with apyrase presented a significant reduction in the mitotic index and other histological characteristics that indicate a less invasive/proliferative tumor (Table 1). Less lymphocytic infiltration and peritumoral edema were observed as well as the absence of pseudopalisading necrosis (Fig. 4b and 4d). Reduction of proliferation induced by apyrase co-injection was confirmed by counting the percentage of Ki67 positive glioma cell nuclei (Table 2) (Fig. 5a and 5b).

Since tumor growth is dependent on the ability to induce angiogenesis, we performed immunohistochemical experiments with CD31. According to counts with CD31, vessel density and neof ormation was higher in the C6 group 20 days after implantation, in comparison with the group treated with apyrase (Fig. 5c and 5d) (Table 2). Confirming this observation, rats treated with apyrase presented less VEGF staining in comparison to the control group (glioma alone) (Fig. 5e and 5f).

Discussion

In the present study, we investigated the effect of the co-injection of the enzyme apyrase with implanted C6 gliomas cells. It is well known that *in vitro* assays for growth

and invasion only represent isolated aspects of the multi-cascade process of the *in vivo* tumor growth (Kaczarek et al. 1999). For this reason, we decided to use an *in vivo* glioma model that, despite its limitations, is useful for the study of growth, angiogenesis and invasion of gliomas (Grobben et al. 2002).

Extracellular ATP could be hydrolyzed by the action of a cascade of enzymes, which includes the family of E-NTPDases: NTPDase1 (CD39), NTPDase2 (CD39L1), NTPDase3 (CD39L3), NTPDase5 (CD39L4) and NTPDase6 (CD39L2) (Zimmermann, 2001) and the more recently described NTPDase7 and NTPDase8 (Shi, et al. 2001; Bigonnesse et al. 2004). Some of these enzymes have been related with different tumors (Dzhandzugazyan et al. 1988; Knowles 1988a; 1988b) and recent studies demonstrated that NTPDase5 (CD39L4) is a proto-oncogene PCPH, which is involved in tumor growth (Paez et al. 2001). According to our results, the C6 cells present a very low expression of the NTPDase1 (CD39), NTPDase2 (CD39L1) and NTPDase3, the three main enzymes involved in the cell surface ATP degradation when compared to astrocytes. This observation, together with our previous results showing that nucleotides and nucleosides induce glioma proliferation and are cytotoxic to neuronal tissue, lead us to hypothesize that the re-establishment of NTPDase expression may reduce glioma growth. Purified apyrase is an enzyme widely used to deplete ATP and hydrolyzes ATP and ADP at the same rate as NTPDase1 (Heine et al. 1999). Therefore, the apyrase may be regulating the extracellular nucleotide concentration and, thus, modulate their biological effects when activated by P2Y and P2X receptors.

Our experiments demonstrate that the co-injection of apyrase significantly diminished the growth of implanted gliomas in rats after twenty days of tumor induction. Furthermore, pathological analysis demonstrated the lack of some important malignant

characteristics, typical of the glioblastomas, in the tumors co-injected with apyrase (Table 1). Among these, of note is the reduction of the mitotic index in the rats treated with apyrase, indicating that ATP has an important role in glioma proliferation *in vivo*. The participation of ADP in this process should not be excluded since this nucleotide can bind to P2 receptors and is potentially hydrolyzed by the injected apyrase.

As mentioned above, angiogenesis is an extremely important process for sustained tumor growth. Studies have demonstrated that C6 cells secrete VEGF (Auguste et al. 2001). Since invasive properties are largely dependent on the presence of new vessels, CD31 was studied and demonstrated a greater staining in the samples from rats implanted with the C6 cells in relation to those co-injected with apyrase (Fig. 5c and 5d). This result was confirmed by the stronger VEGF staining in rats implanted with glioma, when compared with the apyrase group (Fig. 5e and 5f). These results clearly indicate that microvascular proliferation is decreased in tumors treated with apyrase in relation to the control group, with a consequent decrease in the blood flow in tumor areas with high cell proliferation. The insufficient vascular supply may become the limiting factor for tumor growth (Schaper and Buschmann 1999).

In conclusion, the data presented herein clearly show that the presence of an ATP-depleting enzyme at the moment of glioma implantation causes a significant decrease in the growth, angiogenesis and proliferation index. The exact mechanisms to explain these observations remain under evaluation, however, the participation of ATP and the ecto-nucleotidases may be associated with the development of this type of brain tumor in an *in vivo* glioma model.

Acknowledgments

We thank Dr. Matilde Achaval for the help with the microscope photos, Dr. Carmen Gottfried for assistance with the glutamate up-take assay and Neiva Copetti and Jorge A Lopes for their excellent technical assistance. We are also grateful to Dr. Simon C. Robson and to Biogen from Brazil for the gift of the Ki67 and CD31 antibodies. This work was supported by grants from the Brazilian agencies: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (HCPA).

References

Amadio S, D'Ambrosi N, Cavaliere F, Murra B, Sancesario G, Bernardi G, Burnstock G, Volonté C (2002) P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacol* 42:489-501

Auguste P, Gürsel DB, Lemièrre S, Reimers D, Cuevas P, Carceller F, Di Santo JP, Bikfalvi A (2001) Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and-independent mechanisms. *Cancer Res* 61:1717–1726

Bigonnesse F, Lévesque AS, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJG, Sévigny J (2004) Cloning and Characterization of Mouse Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 43:5511-5519

Chan K, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375-80

Chintala SK, Tonn JC, Rao JS (1999) Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Devl Neur* 17:495-502

Dzhandzugazyan KN, Kirkin AF, Straten P, Zeuthen J (1998) Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is over expressed in differentiated human melanomas. *FEBS Let* 430:227-230

Eyupoglu IY, Hahnen E, Heckel A, Siebzehnruhl FA, Buslei R, Fahlbusch R, Blumcke I. (2005) Malignant glioma-induced neuronal cell death in an organotypic glioma invasion model. Technical note. *J Neurosurg* 102(4):738-44

Grobben B, De Deyn PP, Slegers H (2002) Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310(3):257-70

Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H (1999) Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem* 262(1):102-7

Holland EC (2001) Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nature* 2:120-29

Kaczarek E, Zapf S, Bouterfa H, Tonn JRC, Westphal M, Giese A (1999) Dissecting Glioma Invasion: Interrelation Of Adhesion, Migration And Intercellular Contacts Determine The Invasive Phenotype. *Int J Devl Neur* 17: 625-641

Knowles FA (1988a) Inhibition of growth and induction of enzyme activities in a clonal human hepatoma cell line (Li7A): comparison on the effects of epidermal growth factor and an anti-epidermal growth factor receptor antibody. *J Cell Physiol* 134:109-116

- Knowles AF (1988b) Differential expression of ecto-Mg²⁺-ATPase and ecto-Ca²⁺-ATPase activities in human hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys* 263:264-271
- Laws ER, Shaffrey Jr ME (1999) The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. *Int J Neurosci* 17: 413-420
- Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, 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 Neurocol* 64: 211-218
- Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Salbego C, Lenz G, Battastini AMO (2005) Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurocol* 71:135-140
- Neary JT, Kang Y, Tran M, Feld J (2005) Traumatic injury activates protein kinase B/Akt in cultured astrocytes: role of extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J Neurotrauma* 22(4):491-500
- Newlands ES, Foster T, Zaknoen S (2003) Phase I study of temozolamide (TMZ) combined with procarbazine (PCB) in patients with gliomas. *Br J Cancer* 89(2):248-51
- Paez JG, Recio JA, Rouzaut A, Notario V (2001) Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD39L4 (ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene. *Int J Onco* 19:1249-1254
- Patel VJ, Elion GB, Houghton PJ, Keir S, Pegg AE, Johnson SP, Dolan ME, Bigner DD, Friedman HS (2000) Schedule-dependent activity of temozolamide plus CPT-11 against a human central nervous system tumor-derived xenograft. *Clin Cancer Res* 6:4154-57
- Plate KH, Millauer B, Ullrich A, Risau W (1993) Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 53:5822–5827
- Ralevic V And Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413–492
- Schaper W and Buschmann I (1999) VEGF and therapeutic opportunities in cardiovascular diseases. *Cur Op Biotec* 10:541–543
- Shi JD, Kukar T, Wang CY, Li QZ, Cruz PE, Davoodi-Semiromi A, Yang, P, Gu Y, Lian W, Wu DH, She JX (2001) Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *J Biol Chem* 276, 17474-17478
- Takano T, Lin JHC, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M (2001) Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med* 7:1010-1015

Vollmayer P, Koch M, Braun N, Heine P, Servos J, Israr E, Kegel B, Zimmermann H (2001) Multiple ecto-nucleotidases in PC12 cells: identification and cellular distribution after heterologous expression. *J Neurochem* 78(5):1019-28

Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartsmann G, Sarkis JJ, Battastini AMO (2003) Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett* 198:211-8

Ye ZC, Sontheimer H (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 59:4383-4391

Zerbini LF, Wang Y, Cho JY, Libermann TA (2003) Constitutive activation of nuclear factor kB p50/p65 and Fra-1 and junD is essential for deregulated interleukin 6 expression in prostate cancer. *Cancer Res* 63:2206-2215

Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: Some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev Res* 52, 44-56

Figure legends

Figure 1. Comparison of NTPDase family expression in rat cortical astrocytes and rat C6 gliomas by quantitative real-time RT-PCR analysis. The expression of NTPDase members in astrocytes and C6 gliomas was quantitatively analyzed by real-time PCR as described in material and methods. **C6:** rat glioma cell line. **Astr:** cortical rat astrocytes. The results are presented as a ratio of cDNA enzymes/GAPDH.

Figure 2. Tumor size in treated gliomas. Tumor size was measured 20 d after implantation of C6 cells. Rats were treated with temozolomide and 10% DMSO (n=5). Data are the means \pm SEM. #p<0.001; **p<0.01; *p<0.05 for comparison versus control, as determined by ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

Figure 3. Tumor size in rats co-injected with apyrase. Tumor size was measured 20 d after implantation of glioma in the different groups (n=6). **Glioma:** rats implanted with C6 cells. **Control Apyrase:** apyrase was denatured by boiling and co-injecting with the glioma cells. **Apyrase:** the enzyme apyrase (2U) was co-injected with the glioma cells. Mean \pm S.E.M. Statistics as in Figure 2.

Figure 4. The sections of implanted rat glioma were stained with haematoxylin and eosin (H&E). Histological characteristics that define glioblastoma multiform as seen in rats implanted with gliomas (**a,c**) and in rats co-injected with apyrase (**b,d**). Necrosis (**N**) and

microvascular proliferation (**V**), giant cell formation and nuclear pleomorphism (**arrow**).

Scale bars = 100 μm (a,b); 20 μm (c,d).

Figure 5. Immunohistochemical stainings of gliomas. Glioma cell proliferation was assessed by immunostaining for Ki67 positive glioma cell nuclei (**arrows**) in rats implanted with gliomas (**a**) and in rats co-injected with apyrase (**b**). The sections were immunostained for CD31 (**c,d**) and VEGF (**e,f**), demonstrating the density vessels (**arrows**) in rats implanted with gliomas (**c,e**) and in rats co-injected with apyrase (**d,f**). Scale bars = 20 μm .

Fig. 1

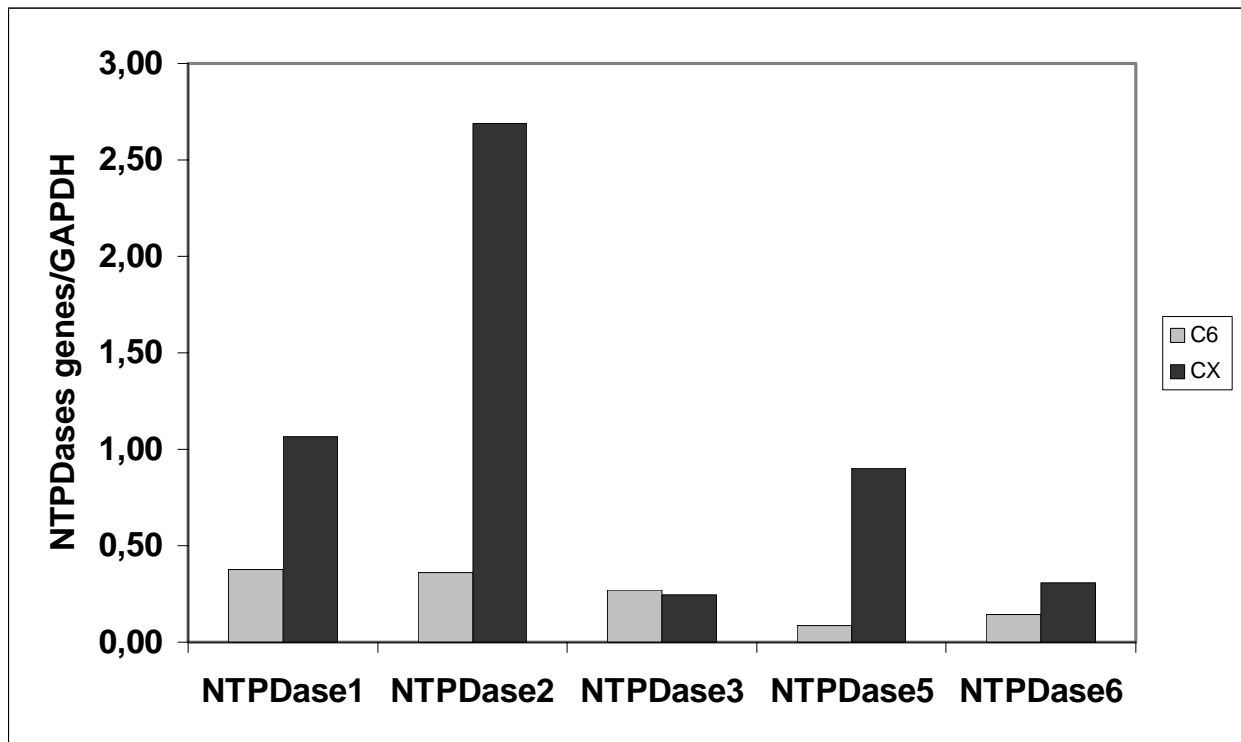


Fig. 2

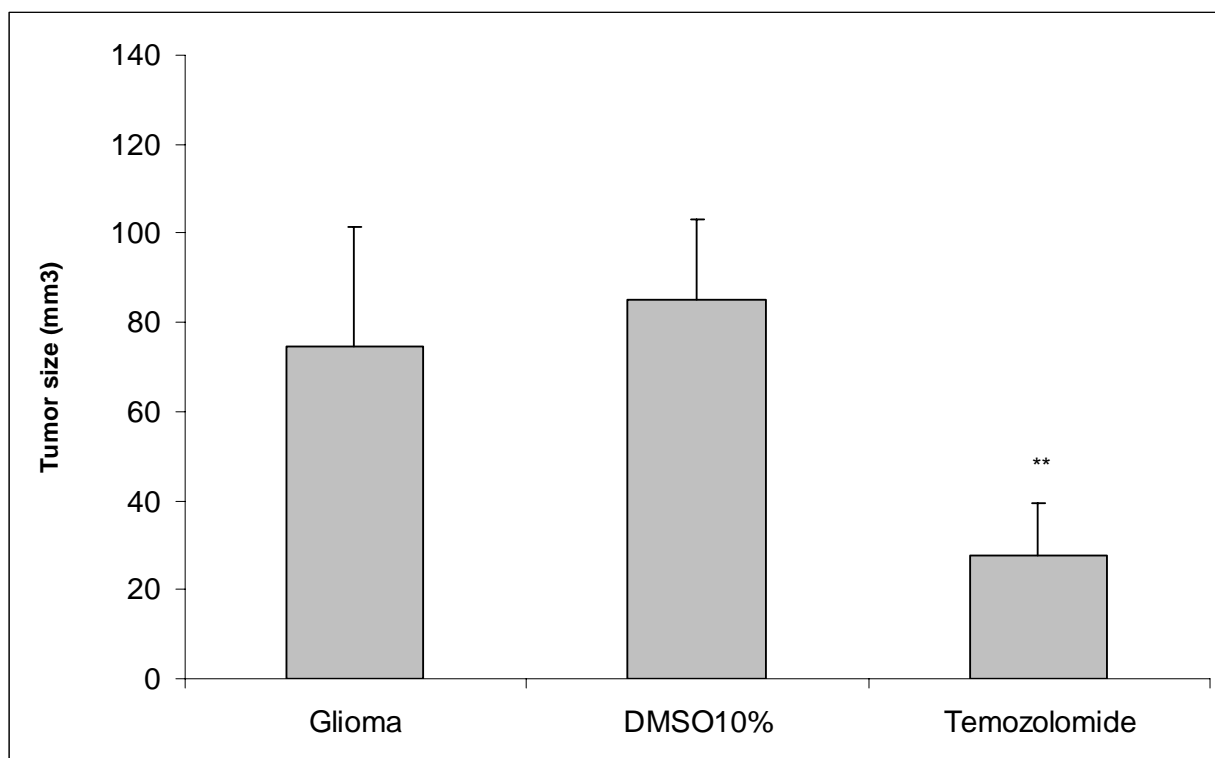


Fig. 3

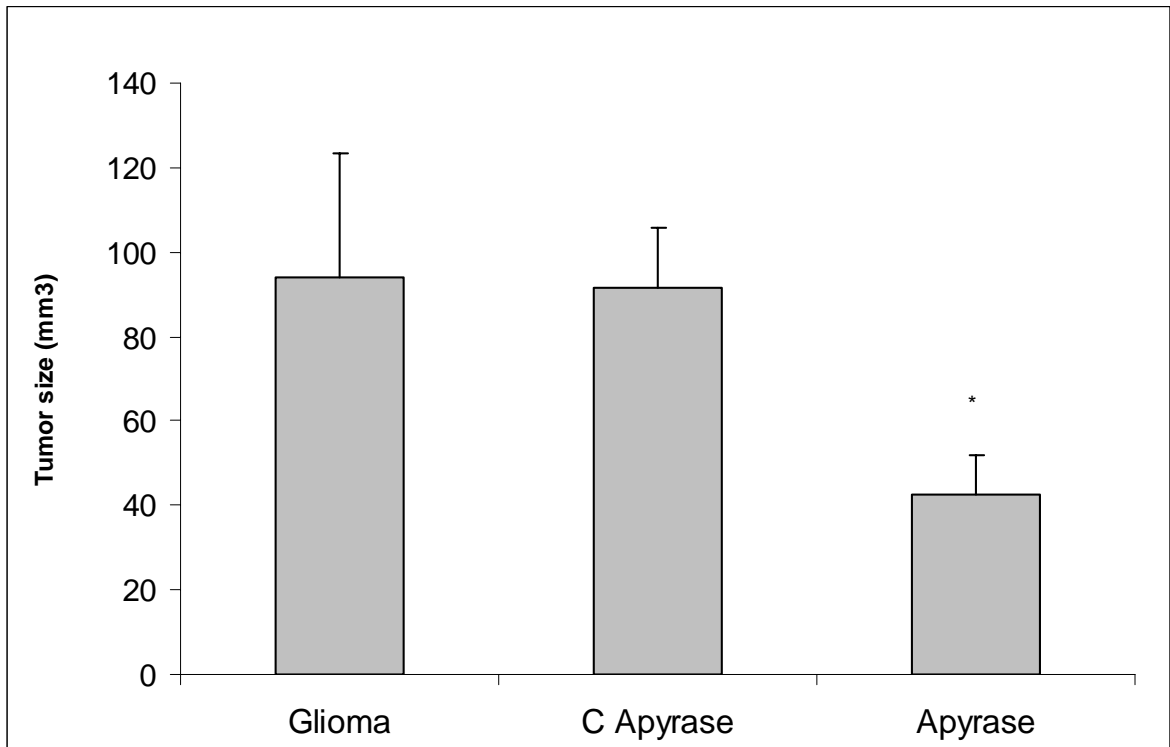


Fig.4

GLIOMA

GLIOMA + APYRASE

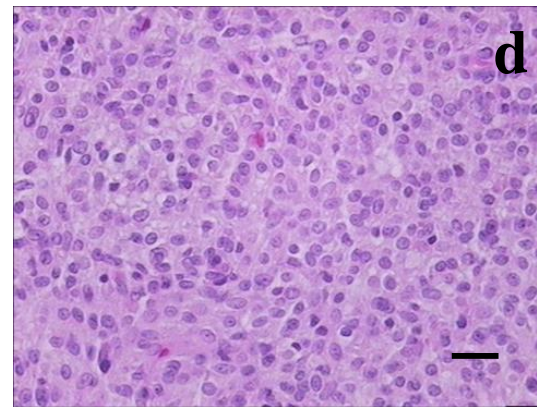
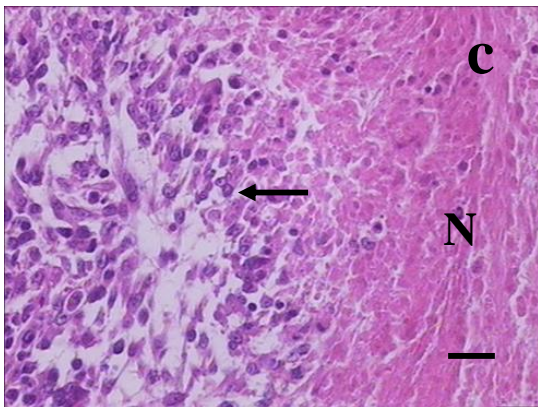
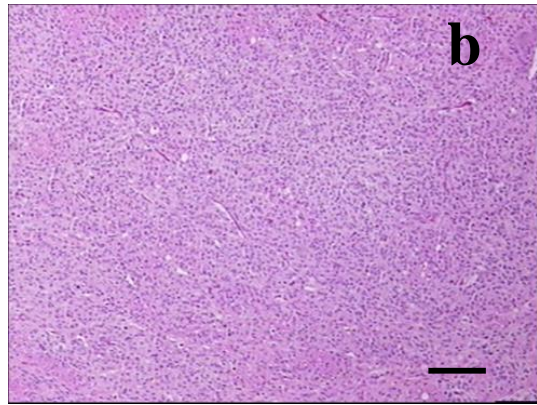
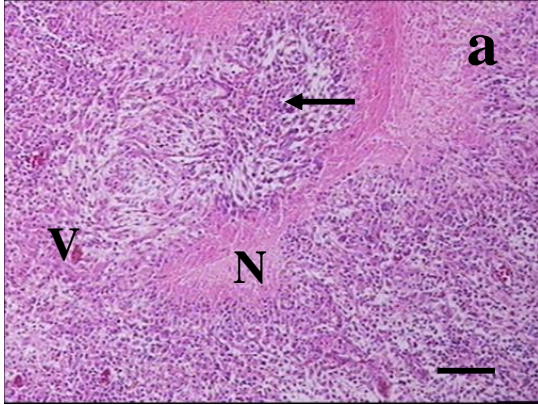


Fig. 5.

GLIOMA

GLIOMA + APYRASE

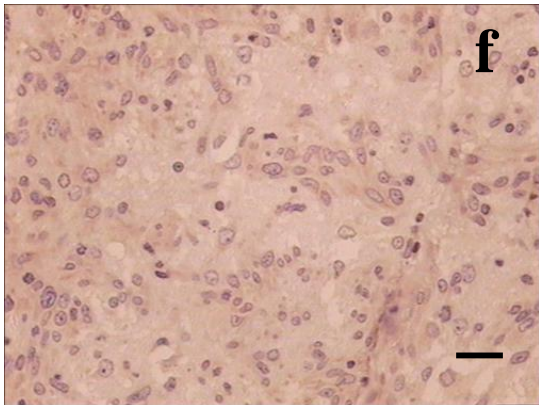
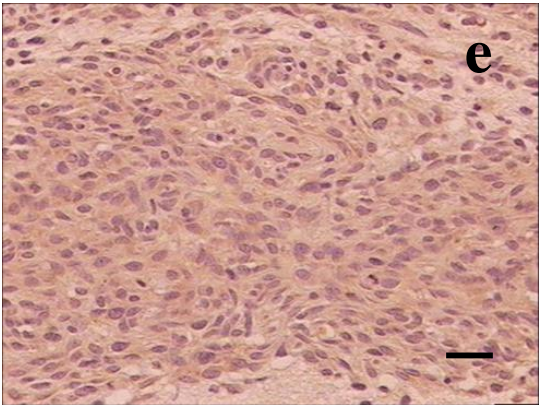
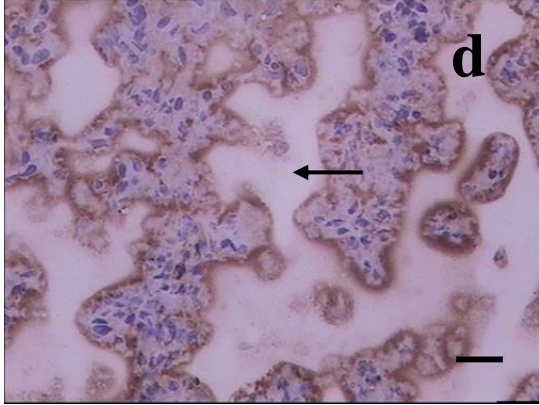
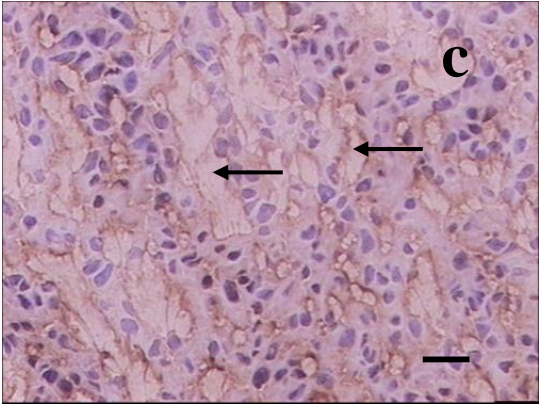
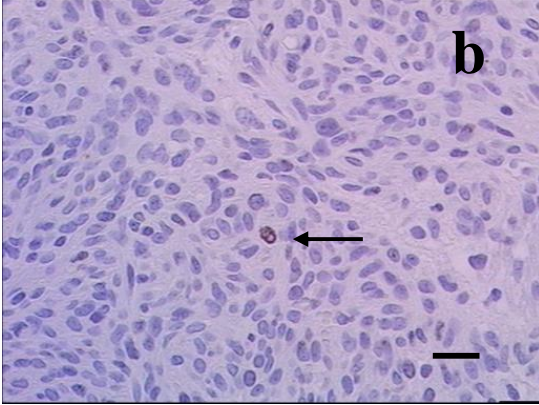
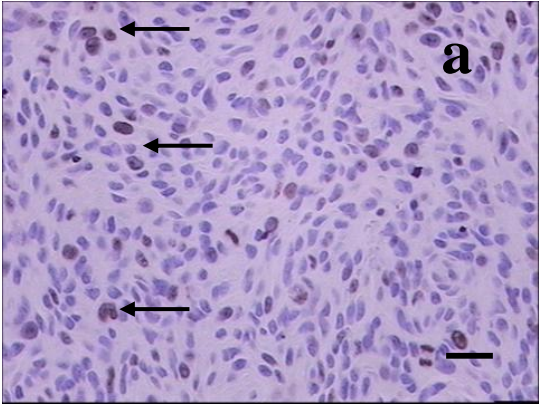


Table 1. Characteristics of intracerebral gliomas and apyrase treated gliomas

	Glioma (n=9)	Glioma + Apyrase (n=8)
Coagulative necrosis	5/9	0/8
Intratumoral Hemorrhage	2/9	1/8
Lymphocytic infiltration	8/9	5/8
Peritumoral edema	5/9	1/8
Peripheric pseudopalisading	3/9	0/8
Mitotic index: mitosis/HPF	14.5 ± 4.7	8.4 ± 2.9*

*P<0.05, Students *t*-Test

HPF – high power field

Table 2. Immunohistochemical analysis of Ki67 and CD31 in rats implanted glioma

	Glioma	Glioma + Apyrase
Ki67 # (n=5)	48.7 ± 2.3	11.6 ± 7.9**
CD31* (n=2)	96 ± 22.6	37.5 ± 3.5

% of positive cells. Data are the means ± SEM

* Data are the means ± SEM for the number of vessels

**p<0.01, Students *t*-test.

3.2.1 ANEXO 1

**STUDY OF OVEREXPRESSION OF RECOMBINANT E-NTPDASE2
IN GLIOMA MODEL *IN VIVO***

**STUDY OF OVEREXPRESSION OF RECOMBINANT E-NTPDASE2
IN GLIOMA MODEL *IN VIVO***

Morrone FB^{1,4}, Wink MR², Oliveira DL¹, Gamermann PW¹, Stella J¹, Meurer L³,
Edelweiss MIA³, Lenz G², Battastini AMO^{1*}

¹*Departamento de Bioquímica, ICBS, ²Departamento de Biofísica IB,*
³*Departamento de Patologia, HCPA, UFRGS, ⁴Faculdade de Farmácia,*
PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding Author: Ana Maria O Battastini¹

e-mail: batas@terra.com.br

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS,
Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo,
90.035.003, Porto Alegre, RS, Brasil
Phone: +55 (51) 3316.5554/ +55 (51) 3316.5553

FAX: +55 (51) 3316.5535

INTRODUCTION

The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) are members of CD39 family, enzymes that control the levels of extracellular nucleotides, thereby modulating purinergically controlled physiological processes. Six of the eight known NTPDases are membrane-bound enzymes; only NTPDase5 and 6 can be released as soluble enzymes. Glioma cells have a low expression of the all NTPDases investigated in comparison with normal astrocytes.

Nucleotides and nucleosides induce glioma proliferation and additionally gliomas are insensitive to cytotoxic effect of ATP. Since previous results showed that rats with implanted glioma and co-injected with apyrase had a significant reduction of the tumor size, we hypothesize that the scavenger of ATP by the re-establishment of NTPDase expression would alter glioma size.

The aim of this study is to verify if the overexpression of the NTPDase 2 on glioma cells affects tumor growth in glioma model in rat.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fungizone were purchased from Gibco BRL; fetal calf serum (FCS) was from Cultilab (Brazil). Hepes, streptomycin, penicillin G, Trizma base and EDTA were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Cell culture

C6 rat glioma cell line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, U.S.A.). Cells were grown in culture flasks in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) with 5% fetal calf serum (FCS).

NTPDase2 / CD39 L1 stable Transfection

C6 cells were transfected with EYFP-NTPDase2 vector (EYFP from Clontech) with FUGENE (Roche) using opti-men medium (Gibco) according with manufacture instructions. Cells expressing NTPDase2 were selected with G418 (Gibco) (1mg/ml) and transfection efficiency was confirmed by fluorescence as well ATPase activity on cells surface.

Glioma implantation

Rat C6 glioma cells at around 70% confluency were trypsinized, washed once in DMEM/5% serum and resuspended in DMEM. A total of one million cells in a volume of 3µl were injected at a depth of 6.0 mm in the right striata (coordinates with regard to

bregma: 0.5 mm posterior and 3.0 mm lateral) of anesthetized male Wistar rats, 250-270 g (Takano et al., 2001).

All the procedures were approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Rat brain fixation and histopathology

After 20 days, the rats were decapitated and the whole brain was removed sectioned and fixed with 10% paraformaldehyde, then transferred to 70% ethanol. Rat brains were processed on a Tissue-Tek VIP (Sakura) and embedded in paraffin. Brains were sectioned at 4-mm thickness and stained with hematoxylin and eosin (H&E) as per standard histopathological technique.

Pathological analysis and tumor volume quantification

At least three hematoxylin and eosin (H&E) sections of each tumor were analyzed by two independent pathologists, blinded for the experimental data. For tumor size quantification, images were captured using a digital camera connected to the microscope and analyzed using Image Tool Software. The total volume (mm³) of the tumor was computed by summing the segmented areas and by the multiplication of the slice resolution.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance A-NOVA, followed by Tukey-Kramer test. *P* values < 0.05 were taken to indicate statistical significance and means \pm SEM are presented.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The results showed that the rats whose implanted glioma cells were transfected with the ATP degrading enzyme, NTPDase 2 (CD39L1) had a significant increase of the tumor size ($p < 0.05$) in comparison with the control groups (Figure 1). High magnification sections of gliomas showed a highly cellular mass below the injection site in rats injected with NTPDase2 transfectants (Figure 2A and B). The same feature was observed in the pathological analysis, which showed a large necrosis zone in the tumor center of rats implanted with NTPDase2 transfected glioma cells (Figure 3B) in comparison to the glioma group (control) (Figure 3A).

Since the NTPDase 2 selectively hydrolyzes nucleoside triphosphates to their corresponding diphosphates, the formation of ADP and its interaction to P2 receptors could be an important mechanism of brain tumors development.

Our data showed that the overexpression of NTPDase 2 causes a significant increase in the glioma size indicating the involvement of extracellular nucleotides degradation on the growth of gliomas *in vivo*.

Acknowledgments

We thank Neiva Copetti and Jorge A Lopes for the excellent technical assistance. We are also grateful to Dr. Simon C. Robson. This work was supported by grants from the Brazilian agencies: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (HCPOA).

LEGENDS

Figure 1. Tumor size analysis in rats implanted with NTPDase2 transfected glioma cells. Tumor size was measured 20 d after implantation of glioma in the different groups (n=6). **Glioma:** rats implanted with C6 cells. **Control Vector:** glioma cells transfected with EYFP vector. **L1 Transfectants:** C6 glioma cells transfected with EYFP-NTPDase2. Data are the means \pm SEM. *p<0.05 for comparison versus the controls, as determined by A-NOVA, followed by Tukey-Krammer test.

Figure 2. Cross-sectional images are shown of rats glioblastoma multiform. Representative tumors from rats implanted with C6 (**A**) or EYFP-NTPDase2 transfected (**B**) glioma cells. High magnification sections of glioblastoma show a highly cellular mass below the injection site (arrows).

Figure 3. Histological sections of the implanted rats glioma. The sections were stained with hematoxylin and eosine (H&E). Arrows indicate the location of tumors. Histological characteristics that define GBM as seen in the rat model: pseudopalisading necrosis and giant cell formation. (**A**) Rats implanted with glioma C6 cells or (**B**) with EYFP-NTPDase2 transfected glioma cells. Original magnification 100x.

Fig 1.

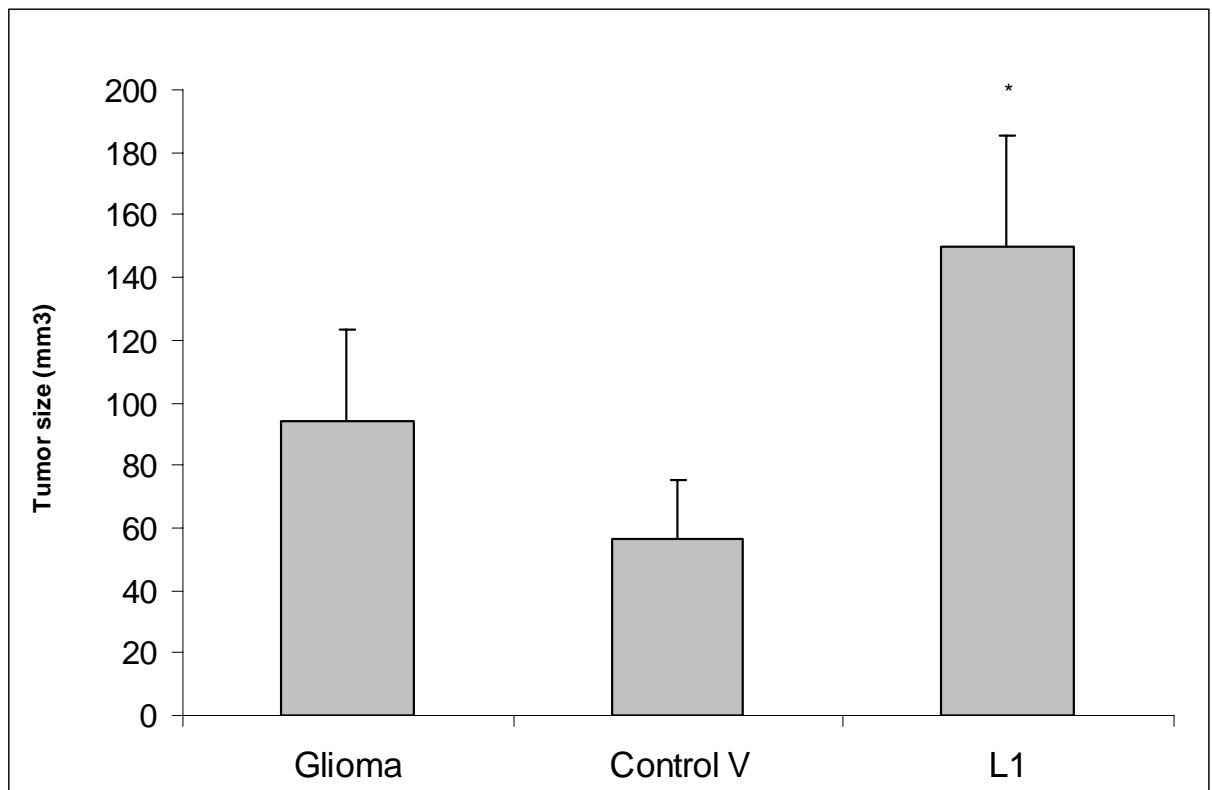


Fig 2.

A.



B.

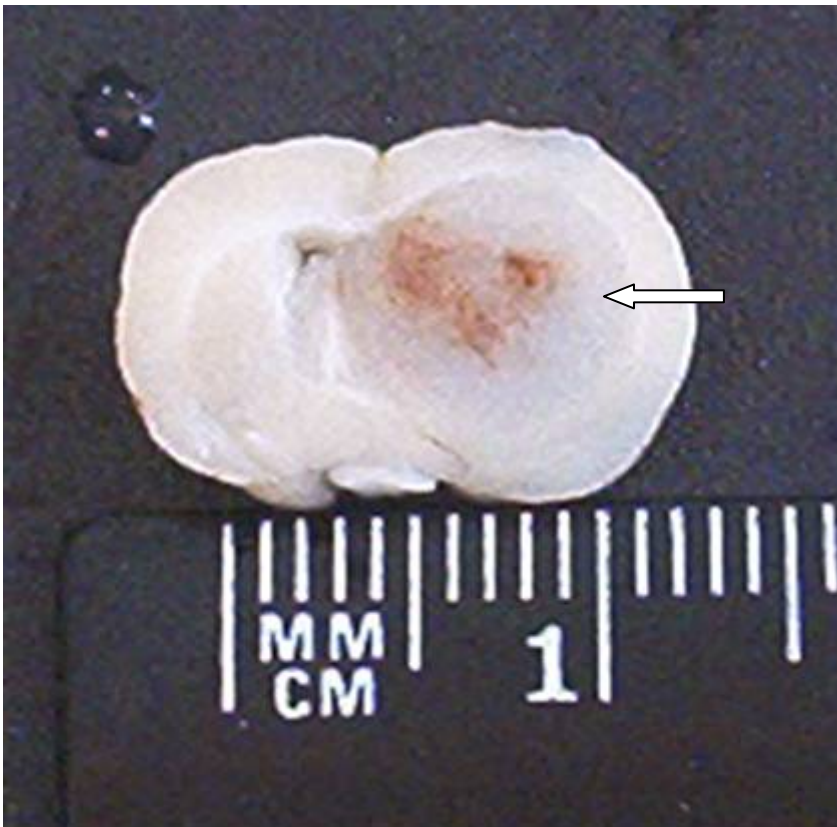


Fig. 3

A.



B.



3.3 *CAPÍTULO 3*

**EVALUATION OF ADENINE NUCLEOTIDE HYDROLYSIS IN
THE SERUM OF RAT GLIOMA MODEL**

Artigo submetido para publicação *Cancer Detection and Prevention*

Evaluation of adenine nucleotide hydrolysis in blood serum of rats with implanted gliomas

Short title: Nucleotide hydrolysis in rat serum with glioma

Category: Original Article

Condensed Abstract: Rats with glioma induction demonstrated a significant increase in blood serum hydrolysis of ATP, ADP and AMP when compared with the controls.

Authorship: Fernando Spiller, MsC^{a,1}, Fernanda B. Morrone, MsC^{a,d,1}, Paula Engroff^a, Diogo L. Oliveira, MsC^a, Patrícia W. Gamermann, MD^a, Luise Meurer, PhD^c, Maria Isabel A. Edelweiss, PhD^c, Guido Lenz, PhD^b, Ana Maria O. Battastini, PhD^{a*}

Affiliation:

^a *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,*

^b *Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências,*

^c *Departamento de Patologia, HCPA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

^d *Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, RS, Brazil.*

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil).

The authors thank Dr. J.J. Sarkis for his critical review of this manuscript, and Neiva Copetti and Jorge A Lopes for their excellent technical assistance.

***Corresponding author:**

Depto. de Bioquímica – ICBS – UFRGS,

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

Tel +55-51-3316-5554

Fax: +55-51-3316-5535

e-mail: batas@terra.com.br

¹ **Both are first authors.**

ABSTRACT

Adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP), and also adenosine, have many important functions in the physiological and pathological conditions of a variety of organisms. The measurement of the enzymatic hydrolysis of these nucleotides in blood serum may be an auxiliary tool in the identification of cellular damage in many pathological conditions. The aim of this study is to evaluate the hydrolysis of the nucleotides, ATP, ADP and AMP, in the blood serum of rats implanted with gliomas. C6 glioma cells were injected in the right striatum of 60 day-old Wistar rats and, twenty days after induction of gliomas, blood serum samples were prepared for the measurement of nucleotide hydrolysis. The rats that underwent glioma induction demonstrated a significant increase in blood serum hydrolysis of ATP, ADP and AMP when compared with the respective controls. Treatment with temozolomide and with 10% dimethyl sulfoxide decreased nucleotide hydrolysis. None of the animals included in this study presented significant alterations in the activities of the enzymes alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase. The identification of these soluble enzymes may contribute to our understanding of the regulation of purinergic signaling in the blood of patients with brain tumors.

Key-words: glioma; rat blood serum; ATPase; ADPase; AMPase; hydrolysis

INTRODUCTION

Purines and pyrimidines (ATP, ADP, adenosine and UTP) have specific extracellular signaling actions involved in the regulation of a variety of functions and appear to have a key role in the development, proliferation and differentiation of cells [1]. In addition to other biological processes, extracellular ATP participates in muscular contraction, cardiac and platelet function, in the immune response and, in high concentrations, may be cytotoxic [2,3,4,5]. Whilst ADP causes platelet aggregation, adenosine can cause vasodilatation, inhibition of platelet aggregation, reduction of heart rate and contractility [6,7]. Adenosine also inhibits renin liberation, decreases the glomerular filtration rate and presents neuromodulator effects [8]. Therefore, the extracellular hydrolysis of nucleotides, producing adenosine, may be considered to be a very important event [9].

The level of exogenous ATP may be increased in various inflammatory and shock conditions, mainly as a consequence of nucleotide release from platelets, endothelial and blood vessel cells [10]. This rise in the exogenous ATP concentration is usually accompanied by the concomitant secretion of various enzymes into the intercellular space [11].

Gliomas are the most common primary brain tumors. They are distinct from other solid tumors and invade the surrounding normal brain tissue, which makes gliomas a major challenge for clinical intervention. First line therapy is surgery, although, total surgical resection of gliomas is not possible, and recurrence of tumor growth is common [12,13].

In our laboratory we have been investigating the involvement of extracellular ATP on the growth of malignant gliomas. We have demonstrated that ATP is degraded very slowly by glioma cell lines when compared with astrocytes [14]. Furthermore, studies have demonstrated a purinergic involvement in glioma proliferation in different cell types [15]. Among the enzymes that degrade ATP, apyrase was shown to decrease lymphoid cell proliferation *in vitro* [16].

Recently, it has been proposed that glioma growth could be involved in the excitotoxic death of the surrounding tissue and injury caused by tumor resection. In fact, two main mechanisms can liberate ATP into the extracellular space around the invasive tumor cells: first, the excitotoxic death of the normal host cells, and second, the injury caused by tumor resection, as occurs during surgery [17]. Thus, the measurement of the ATP enzymatic hydrolysis rate in blood may serve as an auxiliary tool in the identification of cellular damage in various pathophysiological conditions [18].

Considering the effects of purines on tumor growth and the potential role of the nucleotidases present in the serum, the aim of this study is to evaluate the ATP, ADP and AMP hydrolysis in the serum of rats following glioma implantation. This measurement would be a simple biochemical method that is easy to perform and may be used as a cerebral marker for the accompaniment of treatment and tumor recurrence.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fungizone were purchased from Gibco BRL; fetal calf serum (FCS) was from Cultilab (Brazil). Nucleotides (ATP, ADP, AMP), Hepes, streptomycin, penicillin G, Trizma base and EDTA were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Cell culture and glioma induction

The C6 glioma cell line, obtained from the American Type Culture Collection, was cultured in DMEM medium containing 5% FCS, 100 units/ml penicillin G and 100 units/ml streptomycin. The cultures were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ and 95% air atmosphere.

The study was performed in accordance with the University Ethics Committee guidelines for experiments with animals (approval n° 03-050). Male Wistar rats, weighing 200-300g, were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and placed in a stereotactic frame. Glioma cells were injected (10⁶ cells in a volume of 2-3 µl) at a depth of 6 mm in the right striatum with a Hamilton syringe. Injection coordinates with regard to bregma were 0.5 mm posterior and 3.0 mm lateral [19]. Controls with injection of DMEM containing 5% FCS (surgery control group) were also performed.

Treatment with temozolomide

After 10 days of induction of the gliomas, rats were treated with 5 mg/kg/day (i.p.) of temozolomide (TMZ) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final concentration of 10% [20]. For control experiments, rats were treated with 10% DMSO alone during 5 consecutive days (vehicle control).

Pathological analysis and tumor volume quantification

At least three hematoxylin and eosin (HE) sections (4 μ m thick, paraffin embedded) from each tumor were analyzed by two independent pathologists that were blinded for the experimental data. For tumor size quantification, images were captured using a digital camera connected to the microscope and analyzed using Image Tool Software. The total volume (mm³) of the tumor was computed by summing the segmented areas and by the multiplication of the slice resolution.

Measurement of ATP, ADP and AMP hydrolysis

Twenty days after induction of the gliomas, blood samples were drawn after decapitation of rats and were immediately centrifuged at 3,000 g for 10 minutes at room temperature. The serum samples obtained were stored at -20°C for up to 10 days and used for the measurement of nucleotide hydrolysis. ATP and ADP hydrolysis were determined using the method previously described by Oses et al. (2004) [21]. The reaction mixture containing ADP or ATP as substrate (3mM), 112.5 mM Tris-HCl, pH 8.0, was incubated with approximately 1.0 mg of serum protein at 37°C for 40 minutes in a final volume of 0.2 mL. The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice and the amount of inorganic phosphate liberated was measured by the malachite green method [22]. All samples

were centrifuged at 5,000 g for 5 minutes and the supernatant was used for the colorimetric assay. AMP hydrolysis was determined in the same conditions for ATP and ADP, except that the substrate was AMP and at pH 7.5. For all enzyme assays, incubation times and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of the reactions. All samples were run in duplicate. Controls with the addition of the enzyme preparation after addition of TCA were used to correct nonenzymatic hydrolysis of the substrates. Enzyme activities were expressed as units/ per liter.

Determinations of ALT, AST and ALP

The activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) [23] and alkaline phosphatase (ALP) [24] in the serum were determined using commercial diagnostic kits, manufactured by Labtest Diagnostic, Brazil. Enzyme activities were expressed as U/L.

Statistical analysis

The results are expressed as means \pm SD. Multiple group comparisons were performed by ANOVA followed by a Tukey-Kramer *post hoc* test. All analyses were performed using the statistical program, SPSS 11.0 for Windows.

Results

In the present study, we analyzed the changes in the hydrolysis of nucleotides in the blood serum of rats implanted with C6 glioma cells. Firstly, we implanted the glioma cells using a stereotactic surgery. This glioma model is useful for growth, invasion and biochemical studies [25]. Malignant tumors with a high mitotic index, necrosis, giant cells, intratumoral hemorrhage, parenchymal invasion and lymphocytic infiltration were identified during the pathological analysis of the implanted tumors (data not shown). According to the literature, these are characteristics of high-grade glioblastoma multiform grade IV [26,27,28].

The alkylant agent, temozolomide, which induces apoptosis in cancer cells, was utilized to verify the responsiveness of the implanted tumors to a well-established drug used in the treatment of malignant gliomas [29]. In fact, the rats treated with temozolomide showed a significant decrease in tumor size when compared with its vehicle (10% DMSO) and rats with implanted glioma (Table 1). In addition, rats treated with temozolomide survive significantly longer than their respective controls, demonstrating a relative benefit of 100% in rats' survival (Table 1).

The hydrolysis of ATP and ADP were evaluated in the blood serum of control (naive rats), DMEM (surgery control) and glioma implanted rats. Although there was a significant difference between DMEM and control groups, the ATPase and ADPase activities of blood serum of rats with implanted glioma were also significantly different from the DMEM group (Fig 1A and 1B).

Since previous studies have already found an increase in the 5'-nucleotidase activity in the serum of patients with head and neck cancer [30], it seems to be important to analyze this enzyme activity in a glioma model. As also shown in Figure 1,

5'-nucleotidase activity was increased in the serum of rats with implanted brain tumor when compared with the DMEM group (surgery control). The mean 5'-NT activity in the blood serum was 26.3 ± 3.1 , 43.0 ± 3.3 and 53.1 ± 6.5 units/L for the control group, DMEM group and rats with brain implanted tumor, respectively. The DMEM group also presented a significant increase in the AMP hydrolysis in comparison with the control group, indicating that the surgery could be an additional cause of elevation of this enzyme activity in the blood serum (Fig.1C). The same pattern was observed for ATP and ADP hydrolysis (Fig.1A and 1B).

We also investigated the effect of treatment with temozolomide on the hydrolysis of nucleotides in rat serum. The blood serum of rats treated with temozolomide and its vehicle, 10% DMSO, demonstrated a significant decrease in ATP, ADP and AMP hydrolysis when compared with the glioma group (Fig. 2).

It is well known that some of the enzymes studied here can be elevated in the presence of other pathological events, particularly hepatic disorders [31,32]. Thus, to evaluate the possible liver damage in the rats studied we measured the levels of hepatic enzymes: alanine aminotransaminase (ALT), aspartate aminotransaminase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) in the rat blood serum. As shown in Figure 3, none of the animals included in this study presented significant alterations in the AST, ALT and ALP enzymes, discarding the possibility of hepatic alterations in the animals studied.

Discussion

The implantation of malignant cells into animal brain tissue closely resembles the actual mechanisms of tumor growth and has advantages over other models; for example, the presence of inflammatory and vascular reactions is observed, similarly to the pathological situation [12]. In this study, the injection of C6 cells intracerebrally in Wistar rats led to the development of tumors with several characteristics of malignant gliomas, including a high mitotic index, nuclear pleomorphism, and foci of tumor necrosis, intratumoral hemorrhage, lymphocytic infiltration and parenchymal invasion. In some cases, pathological analysis identified palisading cells delineating the foci of necrosis with the occasional formation of edema fluid (manuscript in preparation).

Here, we show that animals with cerebral tumor presented a significant increase in ATP, ADP and AMP hydrolysis in blood serum in comparison to the respective control groups. In addition, data from Figure 1 suggest that the elevated activity of the nucleotidases was not only due to the gliomatosis, but is also due to the surgery itself. These data are supported by the results observed in the DMEM group. The animals of this group, at twenty days after surgery, presented an increase in nucleotide hydrolysis in relation to the control group, and an inflammatory process at the local of the injection (data not shown).

It may be speculated that the increase in nucleotide hydrolysis observed in the DMEM group could lead to the formation of elevated levels of adenosine, an endogenous anti-inflammatory, in the blood circulation as a compensatory mechanism in response to the pro-inflammatory stimulus of the surgery. In this respect, various studies have shown that the agonists of A_{2A} receptors are involved in the blockade of

inflammatory cascades, acting as anti-inflammatory agents and the activation of these receptors improves survival in mouse models of sepsis [33,34].

In regard to the increase observed in the glioma group, several hypotheses may be raised. First, the increased enzyme activity could be related to other cell types present around the tumor. In this regard, several reports have demonstrated that C6 cells preferentially grow around blood vessels, demonstrating their high affinity for the endothelial basement membrane [24,25,35]. An important characteristic of glioblastomas, derived from C6 cells in Wistar rats, is a significant degree of invasion characterized by a diffuse infiltrating border, in which individual cells invade the surrounding brain tissue [36,37]. The preferred route of migration was shown to be along neuronal fibers and through the perivascular space with processes attached to the endothelial basement membrane instead of attachment to astroglial end-feet [26,35,36,38,39]. Therefore, the endothelial cells could be a potential source of the nucleotidases found in the blood serum.

Secondly, the increased enzymatic activity in blood serum found in the present study could be explained by the altered permeability of the blood-brain barrier (BBB), already described in rat C6 glioma models [40]. One of the main problems in patients with glioma is the increase in BBB permeability, leading to edema formation and death [41]. Therefore, the high changes in fluid and cell elements between the blood and cerebrospinal fluid facilitate the transfer of enzymes released by the tumor or adjacent cells to the blood stream.

Finally, this increase may have cerebral origin, probably due to the lyses of cells surrounding the tumor with the consequent release of nucleotides and also the enzymes that hydrolyze these nucleotides.

Although our results have shown that the drug, temozolomide, decreased tumor size and increased the survival rate in relation to the controls (Table 1), the treatment with temozolomide or with 10% DMSO alone decreased the nucleotide hydrolysis in comparison to rats implanted with C6 cells. These last results demonstrate that the effect on nucleotidase activities (and probably adenosine production in the blood) is due to DMSO itself. This observation indicates that the temozolomide and DMSO effects on tumor growth and nucleotidase activities, respectively, involve distinct mechanisms.

Initially, DMSO was used only as a vehicle for the drug, but to our surprise it inhibited the ATP, ADP and AMP hydrolysis activities when compared with the glioma group. This seems to be an important finding, since DMSO is already known to cross the blood–brain barrier and to have potent anti-inflammatory effects [42,43]. One of the anti-inflammatory effects of DMSO includes the decrease of the level of NF- κ B (nuclear factor kappa β) activation in a macrophage-like cell line, correlating with decreased expression of cytokine messenger RNA and TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) bioactivity, suggesting that modulation of NF- κ B activation may provide a mechanism through which antioxidants protect against endotoxemia in murine models [44]. DMSO also inhibits interleukin-8 production in a dose-dependent manner, directly at the transcriptional level, and may reduce NADPH-oxidase activity [45].

In conclusion, the evaluation of the enzymatic hydrolysis of the adenine nucleotides demonstrated alterations in ATP, ADP and AMP hydrolysis, probably as a consequence of the gliomatosis as well as the inflammatory process secondary to the surgery.

Although caution must be exerted in translating the data from laboratory animals to humans, the nucleotidase activities are being tested in human blood samples from healthy donors and patients, to aid in the accompaniment of treatment of glioma

recurrence. Furthermore, the identification of these soluble enzymes may contribute to our understanding of the regulation of the purinergic signaling in the blood of patients with brain tumors.

References

- [1] Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 1998;78(2):113-45.
- [2] Soslau G, Youngprapakorn D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1997;1355:131-40.
- [3] Agteresch HJ, Agteresch PC, Dagnelie JW, van den Berg, Wilson JL. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 1999;58:211-32.
- [4] Di Virgilio F. Dr. Jekyll /Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *J Auton Nerv Syst.* 2000;81:59–63.
- [5] Volonté C, Amadio S, Cavaliere F, D'Ambrosi N, Vacca F, Bernardi G. Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003;2(6):403-12.
- [6] Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8070-74.
- [7] Jarvis GE, Humphries RG, Robertson MJ, Lee P. ADP can induce aggregation of human platelets via both P2Y1 and P2T receptors. *Br J Pharmacol* 2000;129:275-82.
- [8] Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004; 25(1):33-39.
- [9] Birk AV, Bubman D, Broekman MJ, Robertson HD, Drosopoulos JH, Marcus AJ, et. al. Role of a novel soluble nucleotide phospho-hydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: hemostasis, thrombosis, and vascular biology. *J Lab Clin Med* 2002;139(2):116-24.

- [10] Dubyak GR. Purinergic signaling at immunological synapses. *J Auton Nerv Syst.* 2000;81(1-3):64-8.
- [11] Yegutkin GG, Bodin P, Burnstock G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2000;129(5):921-26.
- [12] Holland EC: Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nature* 2001;2:120-29.
- [13] Chintala SK, Tonn JC, Rão JS. Matrix Metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Dev Neurosci* 1999;17:495-502.
- [14] Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartzmann G, Sarkis JJ, Battastini AMO: Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett* 2003;198:211-18.
- [15] Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, Bernardi A, Schwartzmann G, Rodnight R, Lenz G: Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurocol* 2003;64: 211-18.
- [16] Baricordi R, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buelli G, Di Virgilio F. Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X₇ ATP receptor. *J Biol Chem* 1999;274(47): 33206-08.
- [17] Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Salbego C, Lenz G, Battastini AMO. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurocol* 2005;71:135-40.
- [18] Yegutkin GG. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochemistry (Mosc).* 1997;62:724-28.

- [19] Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med* 2001;7:1010-15.
- [20] Patel VJ, Elion GB, Houghton PJ, Keir S, Pegg AE, Johnson SP, Dolan ME, Bigner DD, Friedman HS. Schedule-dependent activity of temozolomide plus CPT-11 against a human central nervous system tumor-derived xenograft. *Clin Cancer Res* 2000; 6:4154-57.
- [21] Osés JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rücker B, Fürstenau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AMO, Sarkis JJF. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci* 2004;74:3275-84.
- [22] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375-80.
- [23] Reitman S and Frankel SA. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957;28:56-63
- [24] Roy AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clin Chem* 1970;16(5):431-36.
- [25] Grobber B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 2002;310(3):257-70.
- [26] Auer R, Del Maestro RF, Anderson R. A simple and reproducible experimental *in vivo* glioma model. *Can J Neurol Sci* 1981;8:325-31.
- [27] San-Galli F, Vrignaud P, Robert J, Coindre JM, Cohadon F. Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. *J Neurooncol* 1989;7:299-304.

- [28] Whittle IR, MacArthur DC, Malcom GP, Li M, Washington K, Ironside JW. Can experimental models of rodent implantation glioma be improved? A study of pure and mixed glioma cell line tumors. *J Neurooncol* 1998;36:231-42.
- [29] Newlands ES, Foster T, Zaknoen S. Phase I study of temozolamide (TMZ) combined with procarbazine (PCB) in patients with gliomas. *Br J Cancer* 2003;89(2):248-51.
- [30] Lal H, Kumar L, Kohli GS, Sharma A, Goel H. Serum enzymes in head and neck cancer. IV: 5-nucleotidase. *J Laryngol Otol* 1989;103(2):200-2.
- [31] Reichling J, Kaplan M. Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Dig Dis Sci* 1988;33:1601-14.
- [32] Pagani F, Panteghini M. 5'-Nucleotidase in the Detection of Increased Activity of the Liver Form of Alkaline Phosphatase in Serum. *Clin Chem* 2001;47(11):2046-48.
- [33] Sullivan GW. Adenosine A2a receptor agonists as anti-inflammatory agents. *Curr Opin Investig Drugs* 2003;4(11):1313-19.
- [34] Gomez G, Sitkovsky MV. Differential requirement for A2A and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Immunobiology* 2003;102(13):4472-78
- [35] Nagano N, Sasaki H, Aoyagi M, Hirakawa K. Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells *Acta Neuropathol (Berl)* 1993;86:117-25.
- [36] Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laws ER, Conger D, Morreale V, Wood L. C6 glioma cell invasion and migration of rat brain after neural homografting: ultrastructure. *Neurosurgery*. 1990;26:622-28.

- [37] Chicoine MR, Silbergeld DL. Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. *J Neurosurg* 1995;83:665-71.
- [38] Goldberg WJ, Laws ER, Bernstein JJ. Individual C6 glioma cells migrate in adult rat brain after neural homografting. *Int J Dev Neurosci* 1991;9:427-37.
- [39] Izumoto S, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Taki T, Hayakawa T. Gene expression of neural cell adhesion molecule L1 in malignant gliomas and biological significance of L1 in glioma invasion. *Cancer Res* 1996;56:1440-44.
- [40] Stewart PA, Hayakawa K, Hayakawa E, Farrell CL, Del Maestro RF. A quantitative study of blood-brain barrier permeability ultrastructure in a new rat glioma model. *Acta Neuropathol (Berl)* 1985;67(1-2):96-102.
- [41] Klatzo I. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 1967;26(1):1-14.
- [42] Broadwell RD, Salzman M, Kaplan RS. Morphologic effect of dimethyl sulfoxide on the blood-brain barrier. *Science* 1982;217:164-66.
- [43] Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1035-41.
- [44] Kelly KA, Hill MR, Youkhana K, Wanker F, Gimble JM. Dimethyl sulfoxide modulates NF- κ B and cytokine activation in lipopolysaccharide-treated murine macrophages. *Infect Immun* 1994;62:3122-28.
- [45] DeForge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 1992;90:2123-29.

Legends

Figure 1. ATPase (A), ADPase (B) and AMPase (C) activities in serum of rats.

Twenty days after induction of the gliomas, blood samples were collected and ATP, ADP and AMP hydrolysis were measured as described in Material and Methods. C = naive rats (n=5); DMEM = surgery control (operation and injection of DMEM, n=8); G = glioma (induction of glioma, n=8). The data are expressed as the mean \pm SD. Significant differences were determined by one-way ANOVA, followed by a Tukey-Kramer post hoc test. (A) * $p < 0.001$, DMEM vs C; # $p < 0.001$, G vs C and DMEM (B) and (C) ** $p < 0.01$, DMEM vs C; # $p < 0.001$, G vs C; * $p < 0.05$, G vs DMEM;.

Figure 2. Nucleotide hydrolysis activities in the serum of rats treated with temozolomide and DMSO.

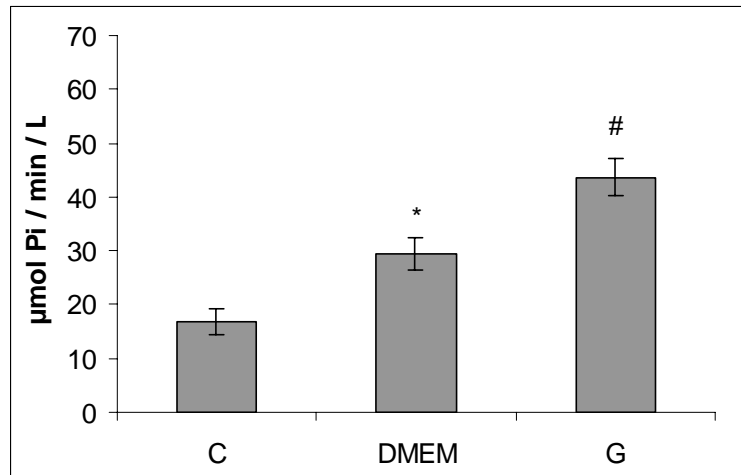
ATPase (A), ADPase (B) and AMPase (C) activities were measured in rat serum. Glioma induction and treatment with temozolomide and with 10% DMSO was performed as described in Material and Methods. G = glioma (n=8); DMSO = vehicle control (temozolomide vehicle alone) (n=4); TMZ = temozolomide treated rats (n=3). The data are expressed as the mean \pm SD. Statistics as in Figure 1. # $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, T and DMSO vs G.

Figure 3. AST (A), ALT (B) and ALP (C) enzymatic activities in the serum of rats.

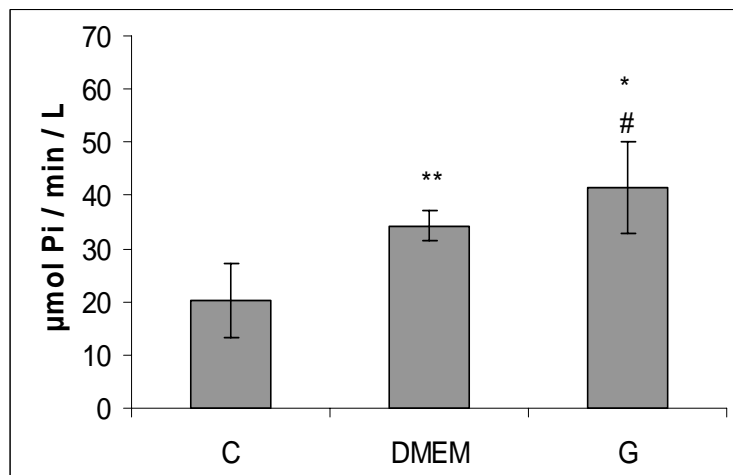
Evaluation of alanine aminotransaminase (ALT), aspartate aminotransaminase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) in the rat blood serum. C = control (n=5); DMEM = surgery control (operation and injection of DMEM, n=8); G = Glioma (induction of glioma, n=8), DMSO = vehicle control (temozolomide vehicle alone) (n=4); TMZ = temozolomide treated rats (n=3).

Figure 1.

A.



B.



C.

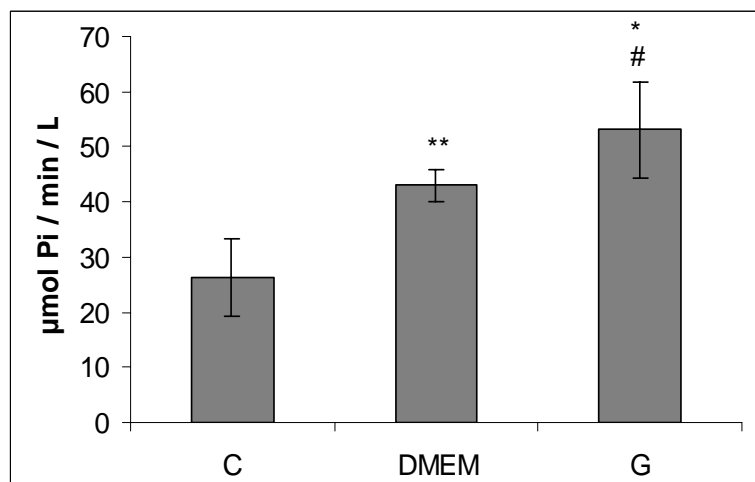
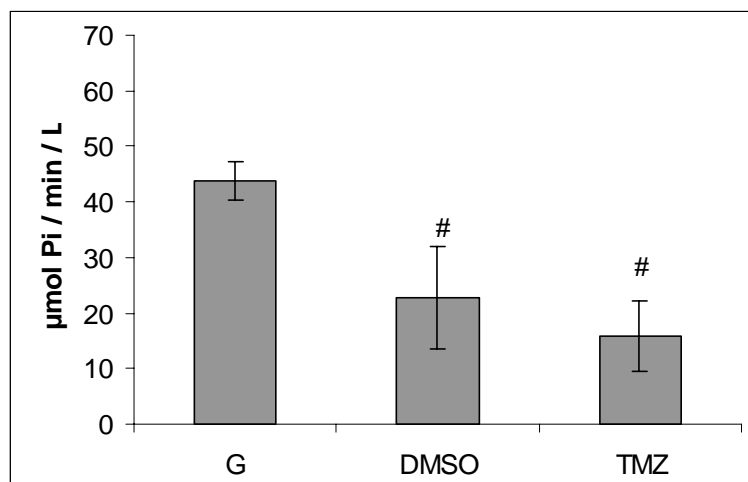
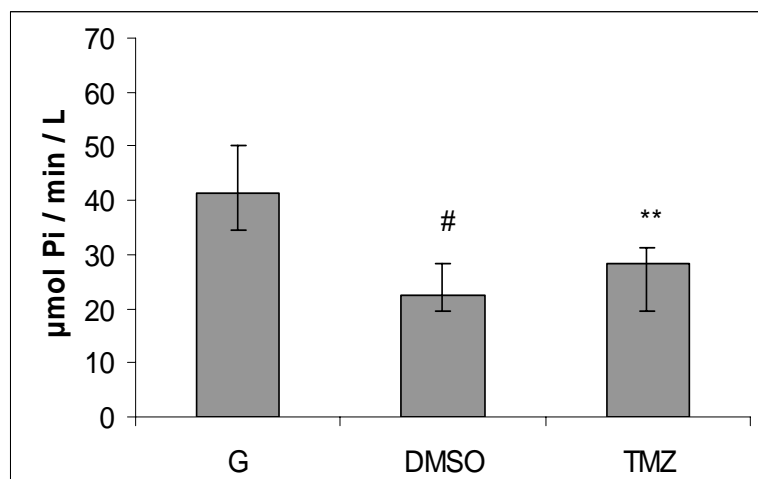


Figure 2.

A.



B.



C.

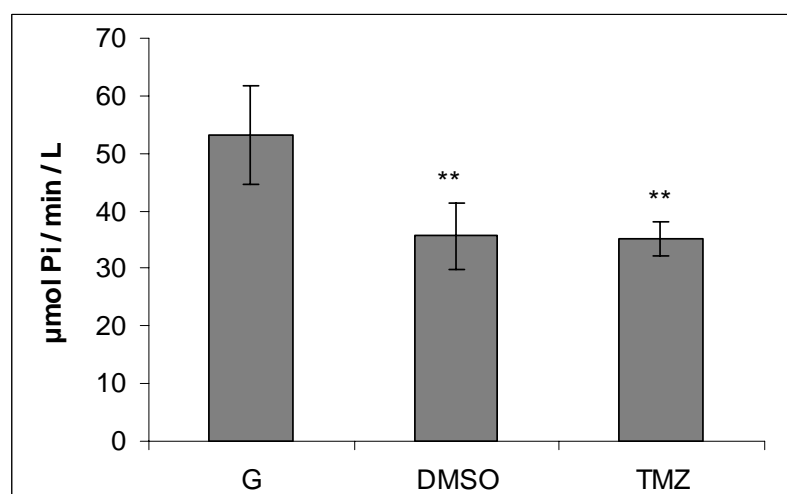
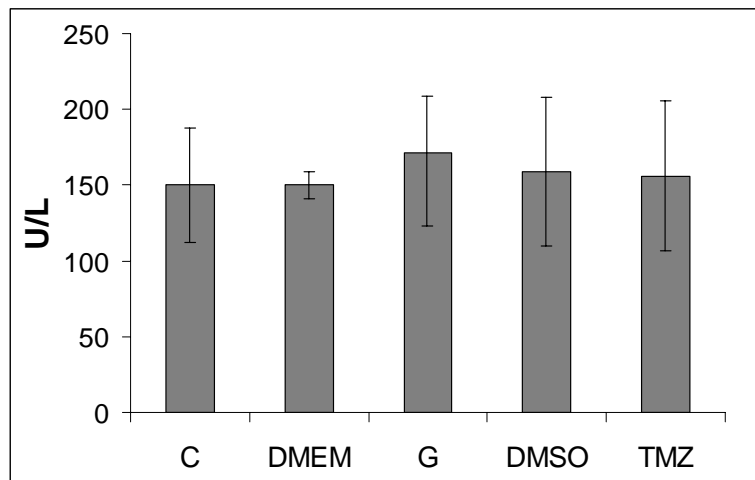
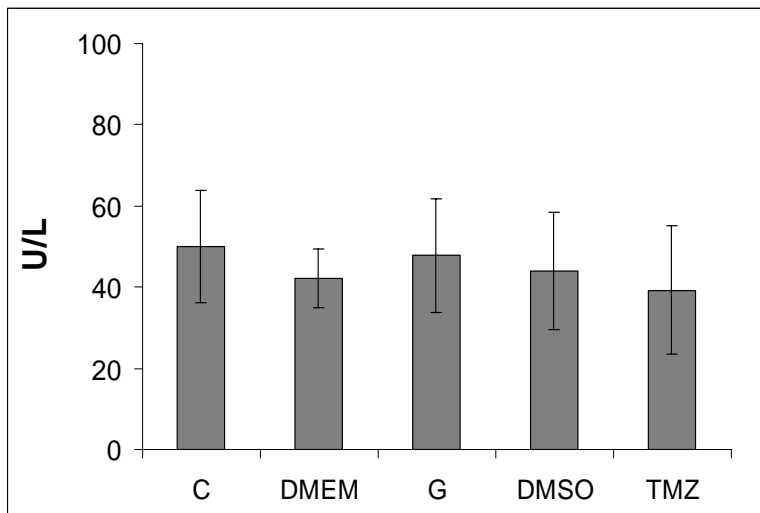


Figure 3.

A.



B.



C.

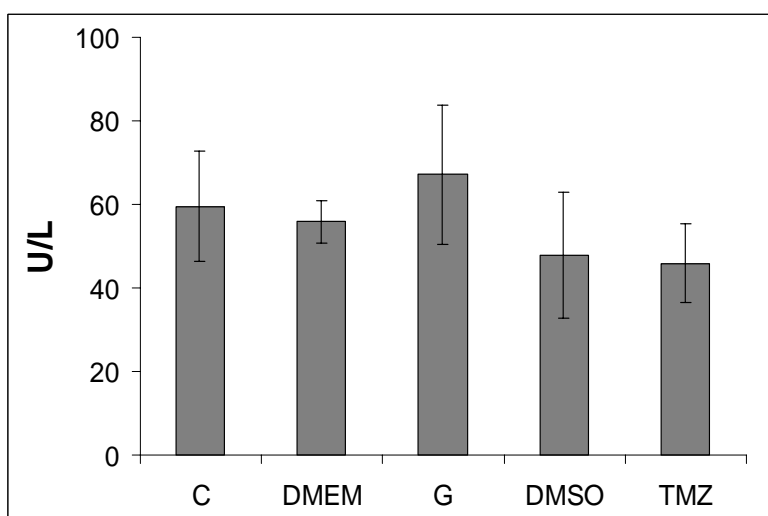


Table 1. Tumor size and survival rate in C6 glioma model (n=5)

	Glioma	DMSO	Temozolomide
Tumor size#	86.7 ± 23	85.2 ± 17.9	27.6 ± 11.9*
Survival rate**	38.7 ± 8.7	37.1 ± 0.6	NM

mm³

** Days of survival (± standard deviation)

NM= no mortality during a 8 week observation period.

* p< 0.05, A-NOVA, followed by Tukey-Krammer test.

4 DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DO ATP EXTRACELULAR NA MORTE DE LINHAGENS DE GLIOMAS E CULTURAS ORGANOTÍPICAS

Na terapia dos gliomas, devem ser alcançados dois aspectos essenciais: o controle local do tumor primário e o bloqueio da invasão das células tumorais no tecido cerebral normal (Rich e Bigner, 2004). Sabe-se, que a terapia inicial no tratamento dos gliomas é a retirada do tumor por meio de cirurgia, porém, a variabilidade no próprio tumor, e a sua localização no cérebro, resultam na inabilidade de fazer uma ressecção completa do tumor. Este procedimento pode causar lesão das células ao redor do tumor, levando à liberação do ATP no meio extracelular (Rathbone et al., 1999; Cicarelli et al., 2001; Nedergaard et al., 2002). Foi também demonstrado que os astrocitomas podem liberar nucleotídeos como ATP e UTP (Harden e Lazarowski, 1999).

Além disso, estudos recentes mostraram que um mecanismo importante usado por gliomas para invadir o tecido nervoso sadio é a excitotoxicidade, através da liberação de glutamato (Takano et al., 2001). Sabe-se ainda que o glutamato pode induzir a liberação de ATP a partir dos astrócitos (Jeremic et al., 2001) e a excitotoxicidade na população neuronal mediada por receptores ionotrópicos de glutamato pode ser modulada pela liberação de purinas (Bennet e Boarder, 2000).

Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que o ATP pode ser considerado como um componente na proliferação de gliomas, induzindo à sinalização autócrina/parácrina em linhagens celulares (Morrone et al., 2003). De fato, este nucleotídeo ativa a cascata da ERK em linhagens de gliomas (Jacques-Silva et al, 2004), e esta cascata de sinalização é fundamental para a indução da proliferação em astrócitos

de ratos (Neary et al., 1999; da Rocha et al., 2000). E ainda, o ATP é liberado em condições glióticas, como a dos gliomas de alta proliferação (Kristt et al., 1993; Neary et al., 1996). Posteriormente, foi demonstrado que o ATP é degradado muito lentamente por gliomas quando comparado com astrócitos, o que pode resultar no acúmulo deste nucleotídeo extracelular ao redor do glioma (Wink et al., 2003).

A partir destes dados, a nossa hipótese é que a morte excitotóxica do tecido adjacente ao tumor por ação do glutamato secretado pelos gliomas, pode ocasionar o extravasamento de altas concentrações de ATP pelas células normais. Estas altas concentrações de ATP e glutamato levariam à morte do tecido normal, e à proliferação dos gliomas iniciando cascatas de sinalização pela sua ligação a receptores purinérgicos.

Para validar, então, nossa hipótese, fomos primeiramente investigar se as células de glioma eram sensíveis à morte excitotóxica pelo ATP. Portanto, na primeira etapa deste trabalho foi avaliado o envolvimento do ATP extracelular na morte de linhagens celulares de gliomas humanos (U138) e de ratos (C6), e em culturas organotípicas de hipocampo de ratos após diferentes tempos de tratamento.

Os resultados deste estudo demonstraram que houve resistência à morte celular nas duas linhagens de gliomas estudadas (C6 e U138) quando tratadas com diferentes concentrações de ATP (Capítulo 1, Figura 2A e 2B) com relação às culturas organotípicas nas quais o ATP extracelular induziu em torno de 60% de morte celular (Capítulo 1, Figura 1). Este resultado foi confirmado por um aumento na atividade da caspase 3 após o tratamento com ATP 5mM (Capítulo 1, Figura 4B).

Sabe-se que altas concentrações de ATP extracelular (mM) induzem à morte celular em diferentes tipos celulares, entre eles, hepatócitos, timócitos, células mielóides e microgliais (Chvatchko et al., 1996; Ferrari et al., 1997, 1999; Di Virgilio, 2000). Em alguns tipos celulares esta morte celular ocorre por necrose, e em outras células a morte

ocorre por apoptose dependente de caspase que é mediada pela abertura dos canais dos receptores P2X₇, com altas concentrações de ATP ou quando o agonista específico BzATP se liga a estes receptores (Di Virgilio, 2000). Neste estudo, ao contrário observou-se que não houve ativação de caspase 3 em linhagens celulares de glioma tratadas com altas concentrações de ATP e BzATP (Capítulo 1, Figura 4B).

Uma hipótese para explicar estes achados se deve ao fato de que os gliomas apresentam a deleção ou inativação da fosfatase PTEN, o que ocasiona uma alta atividade basal de PI3K/Akt, que é uma via anti-apoptótica (Holland, 2001). De fato, a ativação da via Ras/PI3K/Akt, é um dos maiores eventos na gliomagenese (Bonneau e Longy, 2000). Estudos demonstraram que a infecção viral contendo genes de Ras e Akt ativos foram suficientes para induzir gliomas em um modelo *in vivo* (Holland et al., 2000). Portanto, a resistência à morte observada nas linhagens celulares de gliomas pode ser explicada por uma combinação de eventos, nos quais está envolvida a modulação por receptores purinérgicos. Adicionalmente, a resistência à morte pelo ATP nos gliomas, poderia ser devido a mecanismos *downstream* do receptor purinérgico, conforme será discutido posteriormente.

Para explicar melhor este fato, deve-se levar em consideração que os receptores purinérgicos P2 estão implicados na citotoxicidade do ATP, podendo atuar como receptores de “emergência” com o objetivo de restringir a astrogliose excessiva após a lesão, indicando o seu envolvimento na apoptose astrocítica como um mecanismo de controle (Ballerini et al., 2000; Cicarelli et al., 2001). Por outro lado, estudos prévios excluíram a possibilidade do envolvimento de receptores da adenosina na morte causada pelo ATP em culturas organotípicas (Amadio et al., 2002).

O ATP extracelular liberado a partir de grânulos neuronais cerebelares pode causar excitotoxicidade induzida por altas concentrações de glutamato e morte

apoptótica induzida pela deprivação de soro, que podem ser parcialmente inibidos por antagonistas de receptores P2 (Merlo e Volonté, 1996). Por outro lado, aminoácidos excitatórios como o glutamato e purinas podem atuar de maneira sinérgica para garantir a morte celular em culturas de neurônios (Fujii et al., 1999). Em várias populações neuronais a excitotoxicidade mediada por receptores ionotrópicos modula a liberação de purinas (Robertson e Edwards, 1998; Bennet e Boarder, 2000). Além disso, em cultura de astrócitos, o ATP também estimula a liberação de glutamato (Jeremic et al., 2001).

Desta maneira, podemos propor que o acúmulo do ATP extracelular ao redor das células de glioma “*in vivo*” poderia ter um potencial efeito excitotóxico no tecido ao redor do tumor. As células de gliomas se apresentam imunes a esta toxicidade e proliferam em resposta ao ATP, abrindo espaço para o rápido crescimento e invasão do tumor (Morrone et al., 2003). Neste caso, a morte de outras células poderia atuar como um estímulo para o crescimento do tumor, levando a mais morte celular, em um aumento da retroalimentação positiva. Neste processo, o tumor induz liberação do ATP, através da morte de outras células, que estimula a sua própria multiplicação e a morte das células normais, abrindo espaço para ser ocupado por células tumorais, produzindo e liberando mais ATP para a continuação do processo invasivo.

Portanto, um importante achado do presente estudo é que a morte celular induzida por altas concentrações de ATP extracelular observada em culturas organotípicas foi muito maior do que a observada nas duas linhagens de gliomas estudadas.

4.2 O CRESCIMENTO E INVASÃO DE CÉLULAS TUMORAIS EM MODELO DE GLIOMAS

A linhagem celular C6 de ratos é útil no modelo experimental para estudar o crescimento, invasão e metástases em glioblastoma (Grobben et al., 2002). Estudos indicaram que esta linhagem induz a uma resposta imune *in vivo* após sua implantação, resultando em uma formação tumoral de 70–90 % (Beutler et al., 1999; Parsa et al., 2000). As células C6 expressam vários fatores de crescimento, entre eles bFGF, EGF, PDGF-A, PDGF-B, VEGF e seus receptores (Auguste et al., 2001; Kirsch et al., 1998). Além disso, os receptores P2Y₁, P2Y₂ e P2Y₁₂ foram caracterizados em células de glioma C6, usando a medida da concentração de Ca²⁺ intracelular e testando o efeito de agentes farmacológicos específicos (agonistas e antagonistas específicos) (Sabala et al., 2001; Baranska et al., 2004).

Os glioblastomas formados em ratos Wistar e Sprague-Dawley a partir de células C6 mostraram significativos graus de invasão caracterizados por uma borda infiltrativa difusa na qual células individuais invadem o tecido cerebral adjacente (Bernstein et al., 1990; Chicoine e Silbergeld, 1995). A compreensão dos mecanismos de invasão das células de gliomas pode trazer novas abordagens no tratamento destes tumores.

Estudos demonstram que células C6 de glioma de ratos invadem o tecido ao redor como células isoladas (Bernstein et al., 1990; Goldberg et al., 1991). Isto é parcialmente explicado pelo fato de que a invasão é independente da divisão celular. De fato, o movimento celular não é bloqueado pelos tratamentos que interrompem a mitose, mas, ao contrário, é completamente ausente depois da ruptura da estrutura do citoesqueleto (Chicoine e Silbergeld, 1995).

Em nosso estudo, foi realizada a injeção intracerebral de células C6 em ratos Wistar, o que levou ao desenvolvimento de tumores com várias características de gliomas malignos, incluindo um alto índice mitótico, pleomorfismo nuclear, e focos de necrose tumoral, hemorragia intratumoral, infiltração de linfócitos. Em alguns casos, a análise patológica identificou paliçada periférica, delineando os focos de necrose com ocasional formação de edema (Capítulo 2, Figura 4a e 4c).

Foi verificado que gliomas que secretam glutamato têm maior potencial de crescimento pós implante em cérebro de rato, e que aqueles que captam glutamato muitas vezes falham em estabelecer tumores no local do implante (Takano et al., 2001). Com o objetivo de identificar as características das células injetadas foi realizado o experimento de captação de glutamato. Nossos resultados mostraram que as células de gliomas da linhagem C6 injetadas nos ratos não captam glutamato quando comparadas com astrócitos, confirmando os dados da literatura (dados não mostrados).

Para validar nosso modelo de gliomas *in vivo*, foi testado o fármaco temozolomida, um agente alquilante muito utilizado atualmente, que induz apoptose e possui uma ampla atividade anti-tumoral. A análise do tamanho do tumor mostrou que os ratos tratados com temozolomida apresentaram uma redução no tamanho tumoral quando comparados com os grupos controle e DMSO (Capítulo 2, Figura 2). Os ratos tratados com temozolomida tiveram uma sobrevivência significativamente mais prolongada do que seus respectivos controles. O benefício absoluto do tratamento foi de 75%, e o benefício relativo, foi que o tratamento reduziu em 100% o desfecho morte precoce no animais (dados não mostrados). Esses dados sugerem que o tratamento com temozolomida reduz o risco de morte precoce em ratos com gliomas.

Devido a todas às características apresentadas pelos gliomas, à sua localização, ao seu alto índice de proliferação e à sua agressividade, e, principalmente, devido à

presença de receptores purinérgicos, torna-se importante uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos envolvidos na proliferação de gliomas induzida por purinas, o que poderá trazer uma nova abordagem de tratamento desses tumores.

Os resultados obtidos nos permitem concluir que os gliomas induzidos em nosso modelo experimental reproduzem tumores com crescimento e invasão semelhantes aos gliomas malignos primários em humanos, o que nos animou a aprofundar o estudo do sistema purinérgico para uma melhor compreensão do crescimento destes tumores.

4.3 AÇÃO DA APIRASE NO CRESCIMENTO E INVASÃO DOS GLIOMAS

A presumível função das NTPDases ligadas a membrana plasmática, mais especificamente NTPDase 1-3 e NTPDase 8, é regular a concentração de nucleotídeos extracelulares e, portanto modular os seus efeitos biológicos exercidos pela ativação de vários receptores P2Y e P2X (Kukulski et al., 2004). A atividade enzimática da NTPDase1 (CD39) tem sido proposta por regular vários estados fisiológicos, incluindo a função cardíaca, secreção hormonal, respostas imunes, neurotransmissão e agregação plaquetária, todos eles modulando os níveis circulatórios dos nucleotídeos no sangue (Marcus et al., 1997; Gayle et al., 1998).

Vários estudos têm demonstrado que alterações nas nucleotidases podem estar relacionadas ao desenvolvimento de diferentes tumores. Em células de glioma C6, as quais são células gliais com um fenótipo semelhante ao dos astrócitos, Grobber e colaboradores (1999) demonstraram que a principal ecto-enzima que hidrolisa ATP em concentrações fisiológicas (1-10 μ M) é a ecto-nucleotídeo pirofosfatase produzindo AMP e P_i. Enquanto que em altas concentrações, o ATP também é hidrolisado por ecto-ATPases, resultando na formação de ADP, AMP e adenosina.

Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que os nucleotídeos são hidrolisados muito lentamente pelas linhagens de gliomas quando comparados com os astrócitos (Wink et al., 2003). Nossos resultados mostraram que as células C6 de ratos possuem baixa expressão das NTPDases, quando comparadas com astrócitos, estando, deste modo, diminuída a hidrólise do ATP (Capítulo 2, Figura 1). Portanto, para depletar o ATP extracelular, no momento do implante das células tumorais foi testada a enzima apirase.

A apirase purificada de batata utilizada neste estudo possui propriedades semelhantes à NTPDase 1 (CD39). A NTPDase 1 está localizada na microglia no cérebro, na vasculatura do cérebro e outros tecidos (Enjyoji et al., 1999; Braun et al., 2000; Zimmermann, 2000). O gene da NTPDase 1 está posicionado no cromossomo 10 (Chadwick e Frischauf, 1997; 1998), que é parcialmente deletado em 90% dos gliomas (Bensson et al., 1999), e está localizado na mesma região do gene supressor tumoral PTEN, região que está frequentemente deletada em gliomas (Li et al., 1997; Maier et al., 1999). Esta NTPDase é uma enzima amplamente utilizada para depletar ATP em diferentes preparações celulares, e hidrolisa na mesma razão ATP e ADP (Heine et al., 1999).

Os resultados obtidos no Capítulo 2 demonstraram que os ratos tratados com a enzima apirase tiveram uma redução significativa no tamanho do tumor ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle e controle da apirase, nos quais a enzima injetada foi fervida para eliminar o efeito da atividade enzimática, confirmando assim o envolvimento do ATP extracelular na invasão dos glioblastomas *in vivo* (Capítulo 2, Figura 3). Além disso, a análise histopatológica demonstrou uma diminuição em algumas características de malignidade típicas dos glioblastomas nos ratos co-injetados com a apirase. De fato, estes ratos apresentam uma redução no índice mitótico, o que foi confirmado com o

marcador de proliferação celular Ki67, onde a porcentagem de núcleos positivos foi significativamente menor nos ratos tratados com apirase em relação aos gliomas (Capítulo 2, Figura 5a e 5b).

Esta diminuição do índice mitótico poderia confirmar nossa hipótese de que o ATP possui uma grande função na proliferação dos gliomas. A apirase injetada no momento do implante das células tumorais estaria regulando a concentração dos nucleotídeos extracelulares e, desta forma modulando os seus efeitos biológicos. Além disso, pode-se pensar também que pela degradação do ATP e ADP, há a formação de AMP e posteriormente adenosina, deslocando a via de sinalização dos receptores P2 para os receptores P1 em células C6.

Portanto, a resposta biológica do ATP extracelular poderia ser devido ao ATP ou a um dos seus produtos metabólicos (ADP ou adenosina) (Baranska et al., 2004). A adenosina é conhecida por inibir a resposta imune, provocar vasodilatação e estimular a angiogênese (Vannoni et al., 2004). Em células C6, a adenosina interage com receptores A_2 (Pianet et al., 1989), e estudos recentes demonstraram que a estimulação dos receptores A_{2a} aumenta a angiogênese pela diminuição da produção de uma proteína de matrix celular com atividade antiangiogênica, trombospondina 1 (TSP1) (Desai et al., 2005).

Por outro lado, nossos resultados mostraram uma diminuição da densidade vascular nos tumores de ratos co-injetados com apirase. Este fato poderia ser explicado já que a adenosina é recaptada pelos astrócitos (Cicarelli et al., 2001). Além disso, estudos demonstraram um aumento da atividade da ADA, que degrada adenosina a inosina, em tumores (Vannoni et al., 2004). De fato, estudos de microdiálise mostraram que gliomas humanos com alta proliferação apresentam baixos níveis de adenosina extracelular (Melani et al., 2003). Recentemente Bauer e colaboradores (2005)

demonstraram que ocorre aumento na densidade dos receptores A₁ em astrócitos na periferia de gliomas humanos, causado pelo processo de invasão tumoral. Este poderia ser um processo de *upregulation* na tentativa dos astrócitos de contribuir no reparo do tecido na zona ao redor do tumor.

Cabe também salientar que a rota migratória de preferência das células C6 parece ser ao longo das fibras neuronais e através do espaço perivascular com processos ligados à membrana do endotélio ao invés de ligação à astrogliia (Bernstein et al. 1990; Goldberg et al., 1991; Izumoto et al., 1996). O crescimento tumoral necessita de um aumento contínuo do suprimento sanguíneo, desde que os gliomas derivados de células C6 possuem vasos sanguíneos intratumorais, a neovascularização ocorre no local do crescimento tumoral. Em co-culturas com células endoteliais, as células C6 induzem à formação de estruturas capilares-*like*, um efeito que é bloqueado pela suramina (Coomber, 1995), e inibidores de RNA e síntese proteica (Lattera e Goldstein, 1991). Portanto, a degradação do ATP e ADP pela apirase poderia estar contribuindo para a diminuição da proliferação vascular.

O VEGF é secretado pelas células C6 e se torna super-regulado sob condições de hipóxia (Plate et al., 1993). Estes receptores estão ausentes no endotélio de cérebro normal, mas podem ser detectados em células endoteliais dentro e próximo aos tumores derivados de C6 (Ohnishi et al. 1990). Já que as propriedades invasivas são amplamente dependentes da presença de novos vasos, foram feitos experimentos com o anticorpo CD31, marcador de angiogênese, para verificar a ação da apirase neste processo.

Os ratos co-injetados com apirase mostraram uma diminuição na imunodeteccção para CD31 no tumor em relação ao controle, indicando que possa haver diminuição no suprimento sanguíneo (Capítulo 2, Figura 5c e 5d). Este resultado foi confirmado pelos experimentos com VEGF, onde houve uma menor imunodeteccção nos tumores de ratos

tratados com apirase quando comparados com o controle (injeção de células C6) (Capítulo 2, Figura 5e e 5f). Esta diminuição na proliferação de vasos poderia estar relacionada com a degradação do ADP, catalisada pela apirase injetada, indicando que o suprimento vascular insuficiente pode se tornar um fator limitante do crescimento tumoral.

O ADP interage com dois receptores distintos, P2Y₁ e P2Y₁₂, em células de gliomas C6 (Czajkowski et al., 2002). Estudos demonstraram que a expressão da NTPDase 1 inibiu quase completamente a sinalização mediada pelo receptor P2Y₁ (Alvarado-Castillo et al., 2005). Em nosso estudo, o tratamento com uma enzima com características cinéticas da NTPDase 1, poderia estar provocando a diminuição do ADP, necessário para a agregação plaquetária, resultando na regressão de novos vasos formados.

A atividade da ecto-ADPase de células vasculares endoteliais tem sido atribuída à CD39, um antígeno de superfície que atua como um efetivo inibidor de células endoteliais na reatividade das plaquetas (Marcus et al., 1997). Com base nestas observações, pode-se pensar que o desprendimento destas ecto-enzimas da superfície das células endoteliais sob condições de grande estresse pode representar um importante mecanismo de controle da adesão das células sanguíneas para o epitélio vascular. Estes mecanismos podem incluir a formação de compostos anti-adesão, como foi mostrado em um estudo utilizando a ADPase/CD39 solúvel recombinante (Gayle et al., 1998).

Apesar disso a proliferação microvascular nos ratos tratados com apirase ainda parece grande em relação ao tecido normal, porém sabe-se que este suprimento sanguíneo muito frequentemente não é suficiente para áreas com alta proliferação tumoral. Estas observações indicam a importância da regulação dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares no crescimento dos gliomas.

Resultados preliminares com a implantação de células transfectadas com a enzima NTPDase 2 (CD39L1), mostraram que houve um aumento significativo no tamanho do tumor em relação aos grupos controle (Figura 1, Anexo do Capítulo 2). Já que a NTPDase 2 hidrolisa seletivamente nucleotídeos trifosfatados em relação aos difosfatados, a formação do ADP e a sua interação aos receptores P2 poderia ser um mecanismo importante no desenvolvimento dos tumores cerebrais *in vivo*.

Portanto, o conjunto de resultados do Capítulo 2 nos leva a pensar que o sistema purinérgico pode estar efetivamente envolvido no crescimento de gliomas no SNC. Estudos posteriores estão sendo realizados com transfecção das NTPDases para melhor esclarecer a ação da apirase.

4.4 A ATPase, ADPase E E AMPase EM SORO DE RATOS

A medida da hidrólise enzimática dos nucleotídeos no soro sanguíneo pode auxiliar no diagnóstico de dano celular em condições patológicas. Um aumento na atividade sérica da 5'-NT ocorre principalmente em doenças hepáticas e em alguns tumores como câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço e carcinoma de ovário (Lal et al., 1989).

Neste trabalho, nós mostramos que os animais implantados com gliomas apresentaram um aumento significativo na hidrólise de ATP, ADP e AMP no soro em comparação aos respectivos grupos controle (Capítulo 3, Figura 1). Além disso, o tratamento com temozolomida e com 10% DMSO apenas, diminuiu a atividade de hidrólise dos nucleotídeos em comparação com ratos implantados com células C6. Inicialmente, o DMSO foi usado somente como veículo para o fármaco, mas as

resultados mostraram uma inibição das hidrólises do ATP, ADP e AMP quando comparados com o grupo glioma (Capítulo 3, Figura 2). Isto parece ser um achado importante, já que o DMSO é conhecido por cruzar a BHE e possuir potenciais efeitos antiinflamatórios (Santos et al., 2003).

O aumento da atividade enzimática observado poderia ser derivado da liberação de nucleotidases por outras células presentes ao redor do tumor, entre elas as células endoteliais. A este respeito, muitos estudos demonstram que as células C6 possuem alta afinidade pela membrana basal do endotélio e crescem preferencialmente em torno dos vasos sanguíneos (Auer et al., 1981; Nagano et al., 1993). Desta forma, o crescimento das células C6 e a formação do tumor necessitam de uma associação com as células endoteliais (Grobben et al., 2002).

Embora se acredite que as ecto-nucleotidases endoteliais sejam os maiores reguladores da sinalização purinérgica na vasculatura, o metabolismo endotelial prevalece somente na microcirculação, onde a área da superfície endotelial exposta é muito alta para o volume de sangue. Além disso, nucleotidases solúveis podem potencialmente compensar a atividade reduzida das ecto-nucleotidases ligadas à membrana sob certas condições inflamatórias ou choque traumático onde a integridade da parede dos vasos sanguíneos está comprometida. A forma solúvel recombinante NTPDase/CD39 humana foi mostrada ser um potente inibidor de trombose e dano tecidual e é atualmente considerada uma promissora droga (Krotz et al., 2002).

Acredita-se também que a origem deste aumento da atividade enzimática no soro encontrada no presente estudo, poderia ser explicada pela alteração da permeabilidade da BHE, já descrita em modelos de gliomas com células C6 de ratos (Stewart et al., 1985). Um dos principais problemas em pacientes com gliomas é o aumento na permeabilidade da BHE, levando à formação de edema e morte do paciente (Klatzo,

1967). Esta alteração de permeabilidade é, em parte, mediada pela ação da bradicinina que se liga a receptores específicos nas células tumorais, resultando na geração de mensageiros que interagem com as células endoteliais, afetando a sua permeabilidade (Mittal e Mehta, 1995; Sugita e Black, 1998).

O comportamento invasivo das células individuais pode corresponder à re aquisição do comportamento migratório primitivo das células neoplásicas durante o desenvolvimento do SNC. O exemplo extremo deste comportamento é uma condição referida como gliomatose cerebral, na qual o cérebro inteiro está difusamente infiltrado por células neoplásicas com mínima ou nula área focal central do tumor *per se* (Russel e Rubenstein, 1989). O aumento pode ser cerebral e provavelmente tenha ocorrido pela lise das células adjacentes ao tumor, liberando tanto o ATP como também as enzimas que participam da sua hidrólise para o meio intersticial, as quais seriam detectadas no soro dos animais. A alta atividade de hidrólise do ATP poderia ser um mecanismo de controle do organismo na tentativa de diminuir a atividade proliferativa do ATP nas células tumorais (Morrone et al., 2003; 2005). O aumento na hidrólise dos nucleotídeos mostrado aqui, poderia levar à formação de elevados níveis de adenosina na circulação sanguínea com um conseqüente efeito antiinflamatório deste nucleosídeo.

A 5'NT (CD73) está muito ativa em linhagens de gliomas (Wink et al., 2003), fazendo com que haja uma grande formação de adenosina depois da liberação de ATP. A superexpressão da CD73 e aumento da produção de adenosina fazem parte dos mecanismos de defesas do próprio corpo para diminuir inflamação. Condições patológicas como hipóxia e lesão de tecido ocasionam a liberação de grandes quantidades de AMP (Bhatnagar, 2003). Dentre as várias funções em eventos fisiológicos e patológicos, a Ado previne lesão celular durante isquemia no SNC (Olah e Stiles, 1995; Linden, 2001). A adenosina também atua na inflamação por controlar a

ligação dos leucócitos ao endotélio (Cronstein et al., 1992) e atua como um agente anti-inflamatório por se ligar aos receptores A₂ e A₃, através da degranulação de neutrófilos (Bouma et al., 1997). A adenosina também diminui a migração de eosinófilos através da ativação do receptor A₃ (Knight et al., 1997). Recentemente, tem sido mostrada uma função crítica do receptor A_{2a} em respostas inflamatórias de tecidos específicos *in vivo* (Ohta e Sitkovsky, 2001).

Nossos resultados mostram um aumento na atividade sérica da 5-NT nos ratos com gliomas quando comparados com os seus controles (Capítulo 3, Figura 1). O aumento desta atividade enzimática no soro pode ser devido à liberação da mesma diretamente das células tumorais. Este aumento também pode ser de origem hepática, embora seja pouco provável porque o índice de metástases em gliomas é relativamente baixo (0 a 4%). Além disso, nenhum dos grupos de animais incluídos neste estudo apresentou alterações significativas nas enzimas fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase ou alanino aminotransferase (Capítulo 3, Figura 3), demonstrando que não houve um comprometimento da função hepática nos animais implantados.

Concluindo, a avaliação da hidrólise enzimática dos nucleotídeos da adenina demonstrou alterações na hidrólise do ATP, ADP e AMP, provavelmente como uma consequência da inflamação secundária à cirurgia bem como do processo de gliomatose

4.5 O ENVOLVIMENTO DO SISTEMA PURINÉRGICO NO DESENVOLVIMENTO DOS GLIOMAS: ALGUMAS PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesta tese, juntamente com dados de literatura, sugerem que o sistema purinérgico pode ter uma função importante na expansão dos gliomas. De acordo com a nossa hipótese, no processo de crescimento dos gliomas, a

excitotoxicidade causada pelo glutamato nos neurônios (Takano et al., 2001), induzem à liberação do ATP, que estimula a multiplicação dos gliomas e a morte das células normais, abrindo espaço para ser ocupado por células tumorais produzindo e liberando mais ATP para a continuação do processo invasivo. Além disso, o processo inflamatório gerado a partir da cirurgia e da gliomatose *per se* podem alterar os níveis séricos das enzimas que regulam os nucleotídeos extracelulares envolvidos no crescimento tumoral.

Sabe-se que algumas enzimas estudadas aqui podem estar elevadas na presença de outros eventos patológicos (Reichling e Kaplan, 1988; Pagani e Panteghini, 2001). Portanto, níveis elevados de ATP extracelular ocorrem somente transitoriamente em resposta a certas condições fisiológicas e/ou patológicas (Coade e Pearson, 1989; Meghji et al., 1995). As enzimas solúveis, juntamente com ecto-enzimas ligadas à membrana, contribuem para o ciclo ativo entre o ATP circulante e outras purinas, podendo ter implicações significativas para o entendimento da regulação da duração e magnitude da sinalização purinérgica. Sob condições fisiológicas normais, a concentração dos nucleotídeos da adenina no sangue é mantida em valores muito baixos (Coade e Pearson, 1989). Deste modo, a identificação de enzimas solúveis no soro dos pacientes com tumores cerebrais pode trazer novos critérios para entendermos os mecanismos regulatórios da homeostase das purinas no desenvolvimento da patologia.

Resultados preliminares demonstraram uma alteração na hidrólise sérica do AMP nos pacientes com tumores cerebrais de alto grau quando comparados com indivíduos sadios (dados não mostrados). O aumento da atividade da 5'-NT em pacientes com gliomas malignos confirmam dados da literatura (Lal et al., 1989). Esta enzima pode ser liberada para a corrente sanguínea a partir do tumor primário ou dos locais de metástases (Sunderman, 1990). A medida da atividade sérica da 5'-NT não é um bom marcador para o diagnóstico de tumores, uma vez que o aumento na atividade

desta enzima parece ser um denominador comum em pacientes com câncer. Entretanto, este marcador pode ser útil no acompanhamento do tratamento e na detecção de recidiva da doença, pois após o tratamento responsivo ocorre uma diminuição na atividade da enzima, e isto é sugestivo de inatividade do tumor.

Neste caso, o entendimento da função do ATP e da adenosina dentro do grande contexto da expansão dos gliomas é um ponto importante. Os resultados apresentados aqui demonstraram que os gliomas são resistentes à morte pelo ATP ao contrário das células normais. Portanto, a utilização de drogas que degradem este nucleotídeo ou que bloqueiem os receptores purinérgicos localmente no tumor poderiam ser utilizadas como alternativa na diminuição do crescimento dos gliomas. Isto poderia ser feito, por exemplo, mediante a utilização de apirase solúvel (testada neste estudo) localmente no momento da cirurgia para retirada do tumor.

Além disso, os resultados preliminares com células transfectadas com CD39L1, (que degrada principalmente ATP gerando ADP) demonstraram um aumento significativo no tamanho do tumor (Anexo do Capítulo 2, Figura 1 e 2), ao contrário dos resultados da co-injeção de apirase (CD39), que demonstraram uma diminuição no tamanho do tumor. Neste caso, se poderia também pensar em um tratamento com terapia gênica onde o gene da NTPDase 1 (CD39) seria inserido nas células de glioma com o objetivo de depletar ambos os nucleotídeos ATP e ADP em igual velocidade.

Em conclusão, nossos resultados podem abrir novas perspectivas para o estudo das potenciais aplicações do sistema purinérgico no tratamento e acompanhamento da progressão tumoral e de tratamento dos tumores cerebrais.

5 CONCLUSÕES

5.1 GERAIS

- 1) O sistema purinérgico pode estar envolvido no crescimento de tumores no Sistema Nervoso Central.
- 2) A enzima apirase diminuiu significativamente o tamanho do tumor, bem como o índice mitótico em ratos com gliomas.
- 3) Gliomas implantados em ratos apresentam um aumento na hidrólise do ATP, ADP e AMP em soro quando comparado com o soro de ratos controle.

5.2 ESPECÍFICAS

- 1) Linhagens celulares de glioma apresentam resistência à morte induzida por ATP quando comparada com o tecido normal.
- 2) O ATP extracelular induziu morte celular em culturas organotípicas de hipocampo, demonstrando ter função excitotóxica nestas células.
- 3) No modelo de glioma proposto, ratos tratados com o fármaco temozolomida apresentaram uma redução no tamanho tumoral e apresentaram uma sobrevida significativamente mais prolongada, do que seus respectivos controles.
- 4) Os ratos implantados com gliomas tratados com apirase apresentaram um crescimento tumoral menor quando comparado ao grupo controle e ao grupo controle apirase.
- 5) A análise histopatológica demonstrou uma diminuição em algumas características de malignidade típicas dos glioblastomas nos ratos co-injetados

com a apirase. Estes ratos apresentam uma redução no índice mitótico, o que foi confirmado com imunohistoquímica para o Ki67.

- 6) Os ratos co-injetados com apirase mostraram uma diminuição na imunodeteção para CD31 no tumor em relação aos ratos controle implantados com células C6.
- 7) Houve uma diminuição na imunodeteção com VEGF nos ratos tratados com apirase em relação ao controle (glioma).
- 8) Ratos com indução de glioma demonstraram um aumento significativo na hidrólise do ATP, ADP e AMP no soro quando comparados com os respectivos controles.
- 9) Não foi observada alteração nas enzimas FAL, AST e ALT indicando que os animais não apresentavam dano hepático.
- 10) O tratamento com temozolomida e com 10% DMSO diminuiu a hidrólise dos nucleotídeos em soro de ratos com glioblastoma multiforme.

6 PERSPECTIVAS

- 1) Analisar o crescimento e invasão tumoral com a injeção de células transfectadas com CD39L1, CD39L2 e CD39, já que estas NTPDases são muito expressas em astrócitos e pouco expressas em gliomas.
- 2) Analisar por RT-PCR a expressão dos receptores purinérgicos P1 e P2, bem como das nucleotidases em biópsias de pacientes com gliomas.
- 3) Comparar a atividade das nucleotidases no soro de pacientes antes e após a cirurgia de ressecção tumoral, e no pré e pós-tratamento com radioterapia.
- 4) Analisar a atividade das enzimas ATPase, ADPase, AMPase no líquido dos pacientes com tumores cerebrais.
- 5) Testar drogas que bloqueiam os receptores de ATP como alternativa para diminuição do crescimento tumoral em tumores cerebrais.
- 6) Estudar o envolvimento do sistema purinérgico em outros tipos de tumores a fim de poder traçar novas terapias.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO DOUTORADO

MORRONE FB, JACQUES-SILVA MC, HORN AP, BERNARDI A, SCHWARTSMANN G, RODNIGHT R, G. LENZ. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurocol.*; 64:211-218, 2003.

MORRONE FB, HORN AP, STELLA J, SPILLER F, SALBEGO C, LENZ G, BATTASTINI AMO. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurocol.*; 71:135-140, 2005.

SPILLER F, **MORRONE FB**, ENGROFF P, OLIVEIRA DL, GAMERMANN PW, MEURER L, EDELWIEIS MI, LENZ G, BATTASTINI AMO. Evaluation of adenine nucleotide hydrolysis in blood serum of rats with implanted gliomas. *Cancer Detection and Prevention Submitted*, 2005.

MORRONE FB, OLIVEIRA DL, GAMERMANN PW, STELLA J, WOFCHUCK S, MEURER L, EDELWIEIS MI, LENZ G, AMO BATTASTINI. Involvement of extracellular ATP on the growth of gliomas in Central Nervous System. *Cell & Tissue Research Submitted*. 2005.

STELLA J, **MORRONE FB**, ENGROFF P, VIOLA F, BARRIOS CH, BATTASTINI AMO. Effect of STI571 and temozolomide combination on glioblastoma proliferation and 5'-nucleotidase activity *in vitro*. *Manuscript in preparation*, 2005.

SILVA PA, AZAMBUJA A, **MORRONE FB**. Os mecanismos de resistência da gencitabina. *Revista Brasileira de Cancerologia Submitted*, 2005.

MORRONE FB, ENGROFF P, SNAGNOLIN V, AZAMBUJA A, THIESEN FV, BARRIOS CH, BATTASTINI AMO. Evaluation of ectonucleotidases in blood serum of patients with brain tumors. *Manuscript in preparation*, 2005.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JI, Kennedy C, Miras-Portugal, MT, King, BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G. Characterization of the UDP-glucose receptor (renamed here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family, *Trends Pharmacol Sci*; 24:52-55, 2003.

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther*; 64(3):445-75, 1994.

Abbracchio MP, Cattabeni F. Brain adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci*; 890:79-92, 1999.

Abbracchio MP, Saffrey MJ, Hopker V, Burnstock G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience*; 59(1):67-76, 1994.

Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arceci RJ, Kramer R, Guidotti G, Cantiello HF. *Proc Natl Acad Sci*; 90:312-316, 1993.

Agteresch HJ, Dagnelie PC, Van den Berg JW, Wilson JH. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs*; 58(2):211-32, 1999.

Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, Smith DJ, 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 DJ, Jalkanen S. Differential regulation and function of CD73, a glucosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol*; 136, 421-431, 1997.

Alvarado-Castillo C, Harden TK, Boyer JL. Regulation of P2Y1 receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2. *Mol Pharmacol*; 67(1):114-22, 2005.

Amadio S, D'ambrosi N, Cavaliere F, Murra B, Sancesario G, Bernardi G, Burnstock G, Volonte' C. P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacol*; 42:489–501, 2002.

Amberger V, Hensel T, Ogata N, Schwab M. Spreading and migration of human glioma and rat C6 cells on central nervous system myelin in vitro is correlated with tumor malignancy and involves a metalloproteolytic activity. *Cancer Res*; 58:149–158, 1998.

Auer RN, Del Maestro RF, Anderson R. A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci*; 8(4):325-31, 1981.

Auguste P, Gursel DB, Lemiere S, Reimers D, Cuevas P, Carceller F, Di Santo JP, Bikfalvi A. Inhibition of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor activity in glioma cells impedes tumor growth by both angiogenesis-dependent and independent mechanisms. *Cancer Res*; 15;61(4):1717-26, 2001.

Avgeropoulos NG, Batchelor TT. New treatment strategies for malignant gliomas. *The Oncologist*; 4:209-224, 1999.

Ballerini P, Giuliani P, Buccella S, Nargi E, Santavenere C, Scemes E, Rathbone Mp, Caciagli F. P2X7 ATP receptor-mediated modulation of astrocyte proliferation and coupling. *Drug Dev Res*; 50:240, 2000.

Baraldi PG, Borea PA. New potent and selective human adenosine A(3) receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci*; 21(12):456-9, 2000.

Baranska J, Czajkowski R, Sabala P. Cross-talks between nucleotide receptor-induced signaling pathways in serum-deprived and non-starved glioma C6 cells. *Adv Enzyme Regul*; 44:219-32, 2004.

Battastini AM, Oliveira EM, Moreira CM, Bonan CD, Sarkis JJ, Dias RD. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem Mol Biol Int*; 37(2):209-19, 1995.

Battastini AMO, Rocha JBT, Barcelos CK, Sarkis JJ. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res*; 16:1303-1310, 1991.

Bauer A, Langen KJ, Bidmon H, Holschbach MH, Weber S, Olsson RA, Coenen HH, Zilles K. 18F-CPFPX PET identifies changes in cerebral A1 adenosine receptor density caused by glioma invasion. *J Nucl Med*; 46(3):450-4, 2005.

Bennet GC, Boarder MR. The effect of nucleotides and adenosine on stimulus evoked glutamate from rat brain cortical slice. *Br J Pharmacol*; 131: 617-623, 2000.

Bensson A, Robbins SM, Young VW. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur. J. Biochem*; 263:605-611, 1999.

Bernstein M, Marotta T, Stewart P, Glen J, Resch L, Henkelman M. Brain damage from 125I brachytherapy evaluated by MR imaging, a blood-brain barrier tracer, and light and electron microscopy in a rat model. *J Neurosurg*; 73(4):585-93, 1990.

Beutler AS, Banck MS, Wedekind D, Hedrich HJ. Tumor gene therapy made easy: allogeneic major histocompatibility complex in the C6 rat glioma model. *Hum Gene Ther*; 10(1):95-101, 1999.

Bhatnagar A. Surviving hypoxia: the importance of rafts, anchors, and fluidity. *Circ Res*; 2;92(8):821-3, 2003.

Biederbick A, Rose S, Elsasser HP. A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. *J Cell Sci*; 112:2473–2484, 1999.

Bigonnesse F, Lévesque AS, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJG, Sévigny J. Cloning and Characterization of Mouse Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*; 43:5511-5519, 2004.

Boarder MR, Hourani SM. The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol Sci*; 19(3):99-107, 1998.

Bodin P, Burnstock G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res*; 26(8-9):959-69, 2001.

Boeynaems JM, Communi D, Savi P, Herbert JM. P2Y receptors: in the middle of the road. *Trends Pharmacol Sci*; 21(1):1-3, 2000.

Bonneau D, Longy M. Mutations of the Human PTEN. *Gene Hum Mutat*; 16:109-122, 2000.

Bouma MG, Jeunhomme TMMA, Boyle DL, Dentener MA, Voitenok NN, van den Wildenberg FAJM, Buurman WA. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J Immunol*; 158:5400, 1997.

Brandan E, Fleischer B. Orientation and role of nucleoside diphosphatase and 5'-nucleotidase in Golgi vesicles from rat liver. *Biochemistry*; 21(19):4640-5, 1982.

Brandes AA, Pasetto LM, Vastola F, Monfardini S. Temozolomide in patients with high grade gliomas. *Oncology*; 59(3):181-6, 2000.

Braun N, Brendel P, Zimmermann H. Distribution of 5'-nucleotidase in the developing mouse retina. *Dev Brain Res*; 88:79-86, 1995.

Braun N, Fengler S, Ebeling C, Servos J, Zimmermann H. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem J*; 351:639-647, 2000.

Buolamwini JK. Novel anticancer drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*; 3(4):500-9, 1999.

Burnstock G. Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Prog Neurobiol*; 11(3-4):205-22, 1978.

Burnstock G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci*; 22(4):182-8, 2001.

Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*; 24(3):509-81, 1972.

Buschges R, Weber RG, Actor B, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G. Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol*; 9(3):435-42, 1999.

Cambier J, Masson M, Dehen H. *Manual de Neurologia 4ª edição* Paris: Masson Edituer, 1988.

Chadwick BP, Frischauf AM. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. *Mamm Genome*; 8:668-672, 1997.

Chadwick BP, Frischauf AM. The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics*; 50:357-367, 1998.

Chicoine MR, Silbergeld DL. Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. *J Neurosurg*; 83(4):665-71, 1995.

Chintala SK, Tonn JC, Rao JS. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Dev Neuroscience*; 17:495-502, 1999.

Chow SC, Gen K, Orrenius S. Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacology*; 36:1149-1156, 1997.

Chvatchko Y, Valera S, Aubry JP, Renno T, Buell G, Bonnefoy JY. The involvement of an ATP-gated ion channel, P2X₁, in thymocyte apoptosis. *Immunity*; 5:275-283, 1996.

Ciccarelli E, Faccani G, Longo A, Dalle Ore G, Papotti M, Grottoli S, Razzore P, Ghe C, Muccioli G. Prolactin receptors in human pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 42(5):487-91, 1995.

Ciccarelli R, Ballerini P, Sabatino G, Rathbone MP, D'onofrio M, Caciagli F, Di Iorio P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative process in the brain. *Int J Dev Neuroscience*; 19:395-414, 2001.

Ciccarelli R, Di Iorio P, Ballerini P, Ambrosini G, Giuliani P, Tiboni GM, Caciagli F. Effects of exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res*; 39(5):556-66, 1994.

Coade SB, Pearson JD. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res*; 65(3):531-7, 1989.

Collins VP. Gliomas.Pre-cancer: biology, importance and possible prevention. *Cancer Surveys*; 32:37-51, 1998.

Coomber BL. Suramin inhibits C6 glioma-induced angiogenesis in vitro. *J Cell Biochem*; 58(2):199-207, 1995.

Costello JF, Plass C, Arap W, Chapman VM, Held WA, Berger MS, Su Huang HJ, Cavenee WK. Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res*; 57(7):1250-4, 1997.

Coutinho-Silva R, Stahl L, Cheung Kk, De Campos NE, De Oliveira Souza C, Ojcius DM, Burnstock G. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 288(5):G1024-35, 2005.

Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol*; 148:2201, 1992.

Czajkowski R, Barañska J. Cross-talk between the ATP and ADP nucleotide receptor signalling pathways in glioma C6 cells. *Acta Biochim Pol*; 49(4):877-89, 2002.

Czajkowski R, Lei L, Sabala P, Barañska J. ADP-evoked phospholipase C stimulation and adenylyl cyclase inhibition in glioma C6 cells occur through two distinct nucleotide receptors, P2Y(1) and P2Y(12). *FEBS Lett*; 513(2-3):179-83, 2002.

Da Rocha AB, Mans DR, Lenz G, Fernandes AK, De Lima C, Monteiro VF, Goncalves D, Moreira JC, Brunetto AL, Rodnight R, Schwartzmann G. Protein kinase C-mediated in vitro invasion of human glioma cells through extracellular-signal-regulated kinase and ornithine decarboxylase. *Pathobiology*; 68(3):113-23, 2000.

Dai C, Holland EC. Glioma models. *Biochim Biophys Acta*; 1551(1):M19-27, 2001.

Dao TL, Ip C, Patel J. Serum sialyltransferase and 5'-nucleotidase as reliable biomarkers in women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst*; 65(3):529-34, 1980.

Davis FG, Mccarthy BJ, Freels S, Kupelian V, Bondy ML. The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors. Surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. *Cancer*; 85:485-491, 1999.

De Angelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med*; 344(2):114-23, 2001.

de Mendonça A, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Rev*; 33(2-3):258-74, 2000.

Desai A, Victor-Vega C, Gadangi S, Montesinos Mc, Chu Cc, Cronstein Bn. Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin. *Mol Pharmacol*; 67(5):1406-13, 2005.

Di Virgilio F. Dr. Jekyll/ Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *J Auton Nerv Syst*; 81:59-63, 2000.

Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*; 68:213–237, 1929.

Duarte F, Pittella JEH, Ávila CM. *Bogliolo Patologia*. 5 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994.p.723-825.

Dubyak GR, Elmoatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol*; 265:C577-C606, 1993.

Dubyak GR. Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 4(4):295-300, 1991.

Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, von Deimling A. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene*; 16(17):2259-64, 1998.

Dzhandzugazyan KN, Kirkin AF, Thor Straten P, Zeuthen J. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is over expressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett*; 430:227-230, 1998.

Edmonson JH. Needed: qualitative improvement in antisarcoma therapy. *J Clin Oncol*; 13(7):1531-3, 1995.

Enyoji K, Se´Vigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Schulte Am Esch J, II Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD. Targeted disruption of CD39/ ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med*; 5:1010-1017, 1999.

Ethier MF, Chander V, Dobson JG Jr. Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture. *Am J Physiol*; 265(1 Pt 2):H131-8, 1993.

Fastbom J, Pazos A, Palacios JM. The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience*; 22(3):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(4A):2507-11, 1997.

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Susino M, Collo G, Buell G, Di Virgilio F. ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. *Neuropharmacology*; 36:1295-1301, 1997.

Ferrari D, Los M, Bauer MKA, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schulze- Osthoff K. P2Z purinoceptors ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett*; 447:71-75, 1999.

Fleischer B, McIntyre JO, Kempner ES. Target sizes of galactosyltransferase, sialyltransferase, and uridine diphosphatase in Golgi apparatus of rat liver. *Biochemistry*; 32(8):2076-81, 1993.

Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, Ali IU. Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res*; 52(16):4550-3, 1992.

Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U, Williams M. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci*; 18(3):79-82, 1997.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev*; 53(4):527–552, 2001.

Fredholm BB. Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacol Toxicol*; 76(4):228-39, 1995.

Fujii S, Kato H, Kuroda Y. Extracellular adenosine 5'-triphosphate plus activation of glutamatergic receptors induces long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Neurosci Lett*; 276(1):21-4, 1999.

Gayle RB, Maliszewski CR, Gimpel SD, Schoenborn MA, Caspary RG, Richards C, Brasel K, Price V, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Broekman MJ, Marcus AJ. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J Clin Invest*; 101(9):1851-9, 1998.

Giani C, Finocchiaro G. Mutation rate of the CDKN2 gene in malignant gliomas. *Cancer Res*; 54(24):6338-9, 1994.

Girolami V. O Sistema Nervoso Central. in: Cotran RS, Kumar V, Collins. *Robbins Patologia estrutural e funcional*. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Goldberg WJ, Laws ER, Bernstein JJ. Individual C6 glioma cells migrate in adult rat brain after neural homografting. *Int J Dev Neurosci*; 9:427–437, 1991.

Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie GY. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell*; 4:121–133, 1993.

Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*; 233(2):309-19, 1986.

Greenberg S, Di Virgilio F, Steinberg TH, Silverstein SC. Extracellular nucleotides mediate Ca^{2+} fluxes in J774 macrophages by two distinct mechanisms. *J Biol Chem*; 263(21):10337-43, 1988.

Gregor A, Cull A. Radiotherapy for malignant glioma. *BMJ*; 313:1500-1501, 1996.

Grierson JP, Meldolesi J. Shear stress-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients and oscillations in mouse fibroblasts are mediated by endogenously released ATP. *J Biol Chem*; 270(9):4451-6, 1995.

Grinthal A, Guidotti G. Transmembrane domains confer different substrate specificities and adenosine diphosphate hydrolysis mechanisms on CD39, CD39L1, and chimeras. *Biochemistry*; 41(6):1947-56, 2002.

Grobben B, Anciaux K, Roymans D, Stefan C, Bollen M, Esmans EL, Slegers H. An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma. *J Neurochem*; 72(2):826-34, 1999.

Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res*; 310:257–270, 2002.

Guha A. Ras activation in astrocytomas and neurofibromas. *Can J Neurol Sci*; 25(4):267-81, 1998.

Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol*; 8(21):1195-8, 1998.

Harden TK, Lazarowski ER. Release of ATP and UTP from astrocytoma cells. *Prog Brain Res*; 120:135-43, 1999.

Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*; 25(1):33-9, 2004.

Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem*; 262(1):102-7, 1999.

Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, von Deimling A, Fassbender F, Xu HJ, Benedict WF, Yandell DW, Louis DN. The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol*; 36(5):714-21, 1994.

Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nature Genet*; 25:55-57, 2000.

Holland EC. Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proc Natl Acad Sci*; 97(2):62-43, 2000.

Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nature*; 2:120-129, 2001.

Hunsucker SA, Spychala J, Mitchell BS. Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance. *J Biol Chem*; 276(13):10498-504, 2001.

Idelson GH. Molecular diversity of P2 receptors. *Modulator*; 14:11-13, 2001.

Izumoto S, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Taki T, Hayakawa T. Gene expression of neural cell adhesion molecule L1 in malignant gliomas and biological significance of L1 in glioma invasion. *Cancer Res*; 56(6):1440-4, 1996.

Jacques-Silva MC, Bernardi A, Rodnigh R, Lenz G. ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line. *Oncology*; 67(5-6):450-9, 2004.

Jeremic A, Jeftinija K, Stevanovic J, Glavaski A, Jeftinija S. ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. *J Neurochem*; 77:664-75, 2001.

Kaczarek E, Zapf S, Bouterfa H, Tonn JRC, Westphal M, Giese A. Issecting glioma invasion: interrelation of adhesion, migration and intercellular contacts determine the invasive phenotype. *Int J Dev Neuroscience*; 17:625-641, 1999.

Keles GE, Lamborn KR, Berger MS. Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome. *J Neurosurg*; 95:735-745, 2001.

Khakh BS, Kennedy C. Adenosine and ATP: progress in their receptors' structures and functions. *Trends Pharmacol Sci*; 19(2):39-41, 1998.

Kirsch M, Strasser J, Allende R, Bello L, Zhang J, Black PM. Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo. *Cancer Res*; 58(20):4654-9, 1998.

Klatzo I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*; 26(1):1-14, 1967.

Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signaling and the role of accessory proteins. *Cell Signalling*; 14:99-108, 2002.

Knight D, Zheng X, Rocchini C, Jacobson M, Bai T, Walker B. Adenosine A3 receptor stimulation inhibits migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol*; 62(4):465-81, 1997.

Knowles AF. Differential expression of ecto-Mg²⁺-ATPase and ecto-Ca²⁺-ATPase activities in human hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys*; 263:264-271, 1988.

Kohn EC, Liotta LA. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res*; 55:1856-1862, 1995.

Kristt DA, Reedy E, Yarden Y. Receptor tyrosine kinase expression in astrocytic lesions: similar features in gliosis and glioma. *Neurosurgery*; 33(1):106-15, 1993.

Krotz F, Sohn HY, Keller M, Gloe T, Bolz SS, Becker BF, Pohl U. Depolarization of endothelial cells enhances platelet aggregation through oxidative inactivation of endothelial NTPDase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 22(12):2003-9, 2002.

Kukulski F, Sevigny J, Komoszynski M. Comparative hydrolysis of extracellular adenine nucleotides and adenosine in synaptic membranes from porcine brain cortex, hippocampus, cerebellum and medulla oblongata. *Brain Res*; 1030(1):49-56, 2004.

Lal H, Kumar L, Kohli GS, Sharma A, Goel H. Serum enzymes in head and neck cancer. IV: 5-nucleotidase. *J Laryngol Otol*; 103(2):200-2, 1989.

Laterra J, Goldstein GW. Astroglial-induced in vitro angiogenesis: requirements for RNA and protein synthesis. *J Neurochem*; 57:1231-1239, 1991.

Laws ER Jr, Shaffrey ME. The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. *Int J Neurosci*; 17:413-420, 1999.

Legler JM, Gloeckler Ries LA, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan RS, Linet MS. Brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J. Natl Cancer Inst*; 91(23):2050A-22051, 1999.

Lemmens R, Vanduffel L, Teuchy H, Culic O. Regulation of proliferation of LLC-MK2 cells by nucleosides and nucleotides: the role of ecto-enzymes. *Biochem J*; 316:551-557, 1996.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*; 275(5308):1943-7, 1997.

Liang BT, Jacobson KA. A physiological role of the adenosine A3 receptor: sustained cardioprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95(12):6995-9, 1998.

Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 41:775, 2001.

Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*; 330:613-622, 1994.

Maienschein V, Zimmermann H. Immunocytochemical localization of ecto-5'-nucleotidase in cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience*; 70(2):429-38, 1996.

Maier D, Jones G, Li X, Schonthal AH, Gratzl O, Van Meir EG, Merlo A. The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer Res*; 59(21):5479-82, 1999.

Malam-Souley R, Campan M, Gadeau A-P, Desgranges C. Exogenous ATP induces a limited cell cycle progression of arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol*; 264:783-788, 1993.

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, Maliszewski CR. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest*; 99:1351-1360, 1997.

Mateo J, Harden TK, Boyer JL. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br J Pharmacol*; 128:396-402, 1999.

Mckeran RO, Thomas DGT. The clinical study of gliomas. In: *Brain tumours: scientific basis, clinical investigation and current therapy*. In: Thomas DGT, Graham DI, eds. London: Butterworths, 1980:194-230.

McWhinney CD, Dudley MW, Bowlin TL, Peet NP, Schook L, Bradshaw M, De M, Borcherdig DR, Edwards CK. Activation of adenosine A3 receptors on macrophages inhibits tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Pharmacol*; 310(2-3):209-16, 1996.

Meghji P, Pearson JD, Slakey LL. Kinetics of extracellular ATP hydrolysis by microvascular endothelial cells from rat heart. *Biochem J*; 308(Pt 3):725-31, 1995.

Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ. Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. *Am J Physiol*; 255(3 Pt 2):H554-62, 1988.

Meininger CJ, Granger HJ. Mechanisms leading to adenosine-stimulated proliferation of microvascular endothelial cells. *Am J Physiol*; 258(1 Pt 2):H198-206, 1990.

Melani A, De Micheli E, Pinna G, Alfieri A, Corte LD, Pedata F. Adenosine extracellular levels in human brain gliomas: an intraoperative microdialysis study. *Neurosci Lett*; 346(1-2):93-6, 2003.

Merlo D, Volonte C. Binding and functions of extracellular ATP in cultured cerebellar granule neurons. *Biochem Biophys Res Commun*; 225(3):907-14, 1996.

Mittal CK, Mehta CS. Regulation of nitric oxide synthase: role of oxygen radicals and cations in nitric oxide formation. *Adv Pharmacol*; 34:235-50, 1995.

Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sévigny J, Matsue H, Enjoji K, Takashima A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med*; 8:358-365, 2002.

Monteiro AJC. Câncer do Sistema Nervoso Central. In: Murad AD, Katz A. *Oncologia – Bases Clínicas do Tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.p.256-70.

Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, Bernardi A, Schwartzmann G, Rodnight R, Lenz G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurooncol*; 64:211-218, 2003.

Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJ, Salbego CG, Lenz G, Battastini AMO. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neurooncol*; 71(2):135-40, 2005.

Mulero JJ, Yeung G, Nelken ST, Ford JE. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphatases. *J Biol Chem*; 274:20064-20067, 1999.

Muller CE. P2-pyrimidineric receptors and their ligands. *Curr Pharm Des*; 8:2353-2369, 2002.

Nagano N, Sasaki H, Aoyagi M, Hirakawa K. Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta Neuropathol*; 86(2):117-25, 1993.

Neary JT, Baker L, Jorgensen SL, Norenberg MD. Extracellular ATP induces stellation and increases glial fibrillary acidic protein content and DNA synthesis in primary astrocyte cultures. *Acta Neuropathology*; 87:8-13, 1994.

Neary JT, Rathbone MP, Cattebeni F, Abbracchio MP, Burnstock G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *TiNS*; 19:13-18, 1996.

Neary JT, Kang Y, Bu Y, Yu E, Akong K, Peters CM. Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J Neurosci*; 19(11):4211-20, 1999.

Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*; 3(9):748-55, 2002.

Newby AC. Adenosine and the concept of retaliatory metabolites. *Trends Biochem Sci*; 9:42-44, 1984.

Newcomb EW, Alonso M, Sung T, Miller DC. Incidence of p14ARF gene deletion in high-grade adult and pediatric astrocytomas. *Hum Pathol*; 31(1):115-9, 2000.

Ohnishi T, Sher PB, Posner JB, Shapiro WR Capillary permeability factor secreted by malignant brain tumor. Role in peritumoral brain edema and possible mechanism for anti-edema effect of glucocorticoids. *J Neurosurg*; 72:245-251, 1990.

Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in down-regulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*; 414:916, 2001.

Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 35:581, 1995.

Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol*; 10(6):528-35, 1999.

Ongini E, Fredholm BB. Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol Sci*; 17(10):364-72, 1996.

Paez JG, Recio JA, Rouzaut A, Notario V. Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD39L4 (ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene. *Int J Oncol*; 19:1249-1254, 2001.

Pagani F, Panteghini M. 5'-Nucleotidase in the detection of increased activity of the liver form of alkaline phosphatase in serum. *Clin Chem*; 47(11):2046-8, 2001.

Paillass JE. A review of 2,413 tumours operated over a 30-year period. *J. Neuroradiol*; 79–106, 1994.

Parsa AT, Chakrabarti I, Hurley PT, Chi JH, Hall JS, Kaiser MG, Bruce JN. Limitations of the C6/Wistar rat intracerebral glioma model: implications for evaluating immunotherapy. *Neurosurgery*; 47(4):993-9, 2000.

Pastor-Anglada M, Casado FJ, Valdes R, Mata J, Garcia-Manteiga J, Molina M. Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Mol Membr Biol*; 18(1):81-5, 2001.

Paulus W, Tonn JC. Interactions of glioma cells and extracellular matrix. *J Neurooncol*; 24:87-91, 1995.

Pianet I, Merle M, Labouesse J. ADP and, indirectly, ATP are potent inhibitors of cAMP production in intact isoproterenol-stimulated C6 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 163(2):1150-7, 1989.

Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES Jr, Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, Mctaggart RA, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin In Vest*; 109:1031-1040, 2002.

Plate KH, Millauer B, Ullrich A, Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res*; 53:5822-5827, 1993.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*; 50:413-492,1998.

Rao CN, Lakka SS, Kin Y, Konduri SD, Fuller GN, Mohanam S, Rao JS. Expression of tissue factor pathway inhibitor 2 inversely correlates during the progression of human gliomas. *Clinical Cancer Research*; 7(3):570–576, 2001.

Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol*;59(6):663-90, 1999.

Reichling JJ, Kaplan MM. Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Dig Dis Sci*; 33(12):1601-14, 1988.

Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res*; 53(12):2736-9, 1993.

Rich JN, Bigner DD. Development Of Novel Targeted Therapies In The Treatment Of Malignant Glioma. *Natute*; 3:430-446, 2004.

Ridder L. Behaviour of gliomas in vitro vs histopathological grading. *Int J Devl Neuroscience*; 17:541-546, 1999.

Robertson SJ, Edwards FA. ATP and glutamate are released from separate neurons in the rat medial habenula nucleus: frequency dependence and adenosine mediated inhibition of release. *J Physiol*; 508:691-701, 1998.

Rollbrocker B, Waha A, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A. Amplification of the cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) gene is associated with high cdk4 protein levels in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)*; 92(1):70-4, 1996.

Ron E, Modan B, Boice JD Jr, Alfandary E, Stovall M, Chetrit A, Katz L. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N Engl J Med*; 319(16):1033-9, 1988.

Rooprai HK, Vanmeter T, Panou C, Schnuè LL, Trillo-Pazos G, Davies D, Pilkington GJ. The role of integrin receptors in aspects of glioma invasion in vitro. *Int J Devl Neuroscience*; 17:613-623, 1999.

Ruoslahti E. Control of cell motility and tumour invasion by extracellular matrix interactions. *Br J Cancer*; 66:239-242, 1992.

Russel DS, Rubenstein LJ. Pathology of Tumors of the Nervous System (Williams & Wilkins, Philadelphia), pp. 146–147, 1989.

Sabala P, Czajkowski R, Przybyłek K, Kalita K, Kaczmarek L, Baranska J. Two subtypes of G protein-coupled nucleotide receptors, P2Y(1) and P2Y(2) are involved in calcium signalling in glioma C6 cells. *Br J Pharmacol*; 132(2):393-402, 2001.

Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol*; 65(7):1035-41, 2003.

Schaper W, Buschmann I. VEGF and therapeutic opportunities in cardiovascular diseases. *Current Opinion in Biotechnology*; 10:541-543, 1999.

Schetinger MR, Falquembach F, Michelot F, Mezzomo A, Rocha JB. Heparin modulates adenine nucleotide hydrolysis by synaptosomes from cerebral cortex. *Neurochem Int*; 33(3):243-9, 1998.

Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol*; 48(3):167-89, 1996.

Sebastião AM, Ribeiro JA. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *TiPS*; 21:341-346, 2000.

Sévigny J, Lévesque FP, Grondin G, Beaudoin AR. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localization by immunological techniques. *Biochim Biophys Acta*; 1334:73-88, 1997.

Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood*; 99(8):2801-9, 2002.

Shi JD, Kukar T, Wang CY, Li QZ, Cruz PE, Davoodi-Semiromi A, Yang P, Gu Y, Lian W, Wu DH, She JX. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *J Biol Chem*; 276:17474-17478, 2001.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*; 432(7015):396-401, 2004.

Smith JS, Wang XY, Qian J, Hosek SM, Scheithauer BW, Jenkins RB, James CD. Amplification of the platelet-derived growth factor receptor-A (PDGFRA) gene occurs in oligodendrogliomas with grade IV anaplastic features. *J Neuropathol Exp Neurol*; 59(6):495-503, 2000.

Smith TM, Kirley TL. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto- ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim Biophys Acta*; 386:65-78, 1998.

Sneed PK, Gutin PH, Larson DA, Malec MK, Phillips TL, Prados MD, Scharfen CO, Weaver KA, Wara WM. Patterns of recurrence of glioblastoma multiforme after external irradiation followed by implant boost. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 29:719-727, 1994.

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*; 95(1):29-39, 1998.

Stewart PA, Hayakawa K, Hayakawa E, Farrell CL, Del Maestro RF. A quantitative study of blood-brain barrier permeability ultrastructure in a new rat glioma model. *Acta Neuropathol*; 67(1-2):96-102, 1985.

Sugita M, Black KL. Cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibition and intracarotid bradykinin infusion enhances permeability into brain tumors. *Cancer Res*; 58(5):914-20, 1998.

Sunderman FW Jr. The clinical biochemistry of 5'-nucleotidase. *Ann Clin Lab Sci*; 20(2):123-39, 1990.

Takahashi JA, Mori H, Fukumoto M, Igarashi K, Jaye M, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M. Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87(15):5710-4, 1990.

Takano T, Lin JHC, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med*; 7:1010-1015, 2001.

Todd NV, Mcdonagh T, Miller JD. What follows the diagnosis by computed tomography of solitary brain tumour? Audit of one year's experience in southeast Scotland. *Lancet*; 1(8533):611-2, 1987.

Trincavelli ML, Tuscano D, Marroni M, Falleni A, Gremigni V, Ceruti S, Abbracchio MP, Jacobson KA, Cattabeni F, Martini C. A3 Adenosine Receptors in Human Astrocytoma Cells: Agonist-Mediated Desensitization, Internalization, and Down-Regulation. *Mol Pharmacol*; 62:1373-1384, 2002.

Van Daele P, Van Coevorden A, Roger PP, Boeynaems JM. Effects of adenine nucleotides on the proliferation of aortic endothelial cells. *Circ Res*; 70(1):82-90, 1992.

Vannoni D, Bernini A, Carlucci F, Civitelli S, Di Pietro Mc, Leoncini R, Rosi F, Tabucchi A, Tanzini G, Marinello E. Enzyme activities controlling adenosine levels in normal and neoplastic tissues. *Med Oncol*; 21(2):187-95, 2004.

Vlajkovic SM, Housley GD, Greenwood D, Thorne PR. Evidence for alternative splicing of ecto-ATPase associated with termination of purinergic transmission. *Brain Res Mol Brain Res*; 73(1-2):85-92, 1999.

Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander EJ, Batzdorf U, Brooks WH. Randomised comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med*; 80; 303(23):1323-1329, 1980.

Walia M, Mahajan M, Singh K. Serum adenosine deaminase, 5'-nucleotidase & alkaline phosphatase in breast cancer patients. *Indian J Med Res*; 101:247-9, 1995.

Wang DJ, Huang NN, Gonzalez FA, Heppel LA. Multiple signal transduction pathways lead to extracellular ATP-stimulated mitogenesis in mammalian cells: I. Involvement of protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Cell Physiol*; 146(3):473-82, 1991.

Wang TF, Guidotti G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase. *J Biol Chem*; 271:9898-9901, 1996.

Wang TF, Guidotti G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *J Biol Chem*; 273:11392-11399, 1998.

Weiss HD. Neoplasmas. In: Samuels MA. *Manual of Neurologic Therapeutics*. 5 ed. Boston: Little, Brown and Company, 1995.

White N, Butler P, Burnstock G. Human melanomas express functional P2X7 receptors. *Cell Tissue Res* 321: 411-418, 2005.

Williams M, Jarvis MF. Purinergic and pyrimidinergic receptors as potential drug targets. *Biochem Pharmacol*; 59(10):1173-85, 2000.

Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartzmann G, Sarkis JJ, Battastini AMO. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett*; 198:211-8, 2003.

Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 84(19):6899-903, 1987.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 89(7):2965-9, 1992.

Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neurooncol*; 4:278-299, 2002.

Yamaguchi F, Saya H, Bruner JM, Morrison RS. Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91(2):484-8, 1994.

Ye ZC, Sontheimer H. Glioma Cells Release Excitotoxic Concentrations of glutamate. *Cancer Res*; 59:4383-4391, 1999.

Yeung G, Mulero JJ, McGowan DW, Bajwa SS, Ford JE. CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. *Biochemistry*; 39:12916-12923, 2000.

Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J*; 285(Pt 2):345-65, 1992.

Zimmermann H. Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci*; 17:420-426, 1994.

Zimmermann H. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev Res*; 39:337-352, 1996.

Zimmermann H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci*; 20(6):231-6, 1999.

Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 362(4-5):299-309, 2000.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and note on nomenclature, *Drug Dev Res*; 52:44-56, 2001.