

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

**QUERCETINA: EFEITOS SOBRE PARÂMETROS PROLIFERATIVOS E SOBRE
A ECTO-5'-NUCLEOTIDASE EM LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U138MG**

ELIZANDRA BRAGANHOL

Orientadora

DRA. ANA MARIA O. BATTASTINI

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre

2006

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”. (Paulo Freire)

*Aos meus Pais,
Waldir e Cedina.*

AGRADECIMENTOS

A Ana, minha querida orientadora, por ter sido uma das principais responsáveis pelo meu crescimento científico, intelectual e pessoal durante esses anos de convivência. Agradeço por ter-me dado liberdade para desenvolver essa dissertação, por confiar no meu trabalho, pela amizade.

A Márcia que também me acompanhou desde o início, grande amiga e companheira de todas as horas. Agradeço por toda ajuda, disponibilidade e empenho sempre presentes ao longo da nossa convivência. Pela contribuição valiosa no meu crescimento humano e científico.

Ao Guido, por sempre dar contribuições valiosas aos nossos trabalhos, por nos contagiar com a sua paixão pela ciência! Agradeço pela amizade, pelos bons momentos de convivência!

A Alessandra Tamajusuku que começou a caminhada científica junto comigo. Amiga maravilhosa e querida, sempre presente: no trabalho, nas viagens de congresso, nas festas... Grande companheira!

Aos amigos do laboratório de Enzimologia e aos amigos distribuídos pelo Departamento de Bioquímica, os quais sou muito grata por toda ajuda, pelo espírito de colaboração e de amizade.

Queridas amigas: Déia, Vanessa, Bibi, Ana Elisa, Dani, Gabiru, Giana, Rô, Renata, Débora. Pela amizade, pelos momentos de descontração indispensáveis para tornar a vida mais leve.

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

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação.

Ao CNPq, FAPERGS, PROPESQ/ UFRGS.

A minha família aqui de POA, meus amigos de apartamento Rô e Jean (que, infelizmente, não está aqui agora, mas volta em breve). Pela excelente convivência! Pela amizade e confiança, pelo respeito à individualidade de cada um, pela compreensão e carinho.

Aos meus pais queridos, Waldir e Cedina, por terem consciência do valor do estudo e por sempre se empenharem na minha formação e na das minhas irmãs. Pelo amor incondicional. Pelo belo exemplo de honestidade, responsabilidade e trabalho.

As minhas irmãs queridas, Lu e Fabi, e aos meus cunhados, Paulo e Valmir, que são como irmãos para mim. Pelos conselhos, pela amizade e amor.

Aos meus sobrinhos, Jonas e Estefânia, que nos últimos dois anos deram um colorido especial à minha vida.

Agradeço à família Hilbig por todo o carinho, por terem me colhido tão bem e por toda a torcida.

Ao Emílio, meu amor, meu raio de sol. Presente sempre, nos bons e maus momentos... Em todas as horas.

RESUMO

Gliomas são os mais comuns e devastadores tumores primários do sistema nervoso central. Os nucleotídeos da adenina são moléculas sinalizadoras no meio extracelular, envolvidas em importantes condições fisiológicas e patológicas. O ATP, neurotransmissor excitatório, e a adenosina, neuromoduladora, entre outros efeitos, podem induzir proliferação celular em linhagens de gliomas. Os eventos induzidos pelos nucleotídeos extracelulares são controlados pela ação das E-NTPDases, que hidrolisam o ATP até adenosina extracelularmente. Recentes estudos epidemiológicos têm sugerido que os flavonóides derivados da dieta, em particular a quercetina, apresentam um papel benéfico em prevenir ou inibir a tumorigênese.

Assim, primeiramente nós avaliamos o efeito antiproliferativo da quercetina em linhagem de glioma humano U138MG. O estudo demonstrou que este flavonóide induziu em cultura de gliomas: (1) diminuição da proliferação e da viabilidade celular; (2) morte celular via necrose e apoptose; (3) parada no ciclo celular na fase G2 e (4) diminuição do índice mitótico. Além disso, nós demonstramos que a quercetina, enquanto promoveu regressão tumoral, protegeu culturas organotípicas hipocâmpais do dano isquêmico. Em conjunto, esses dados sugerem que a quercetina exibe efeitos antiproliferativos direcionados para as células tumorais e reduzida citotoxicidade para células normais, características altamente desejáveis na quimioterapia.

Dados do nosso laboratório demonstram que o metabolismo extracelular das purinas encontra-se alterado em linhagens de gliomas com relação a culturas de astrócitos, sugerindo que mudanças no sistema purinérgico podem ser uma característica dos gliomas que potencialmente podem contribuir para o seu fenótipo de malignidade. Assim, o passo seguinte desse trabalho foi investigar o perfil de secreção dos derivados da adenina, o metabolismo extracelular do AMP e a ação da quercetina sobre o sistema purinérgico. As culturas de glioma apresentaram secreção de ATP, o qual foi detectado em maiores níveis com relação as outras moléculas avaliadas, ADP, AMP, adenosina e inosina. O AMP extracelular foi eficientemente metabolizado pelos gliomas, demonstrando uma ecto-5'-NT/CD73 muito ativa. Adicionalmente, quercetina interagiu com o sistema purinérgico, inibindo não-competitivamente a atividade da ecto-5'-NT/CD73 e modulando negativamente a sua expressão. Nós sugerimos que a inibição da atividade da ecto-5'-NT/CD73 pode resultar em um decréscimo na disponibilidade de adenosina extracelular, uma promotora tumoral. Tal efeito pode estar correlacionado com a inibição da proliferação promovida pela quercetina nessa linhagem de glioma.

Nossos dados sugerem que a quercetina pode ter uma função importante na inibição da proliferação dos gliomas, atuando em diferentes vias de sinalização, incluindo o sistema purinérgico. Assim, esse estudo abre novas perspectivas para as potenciais aplicações dos flavonóides na prevenção e tratamento de tumores cerebrais.

ABSTRACT

Gliomas are the most common and malignant of the primary brain tumors. Adenine nucleotides are important extracellular signaling molecules in both physiological and pathological conditions. ATP, an excitatory synaptic transmitter, and adenosine, a neuromodulator, induce proliferation in glioma cell lines. The events induced by extracellular adenine nucleotides are controlled by the action of E-NTPDases, that hydrolyze ATP into adenosine in the extracellular space. Recent epidemiological studies have suggested that diet-derived flavonoids, in particular quercetin, may play a beneficial role by preventing or inhibiting tumorigenesis.

First, we evaluated the antiproliferative effect of quercetin in human U138MG glioma cell line. The study showed that quercetin induced in glioma cell cultures: (1) a decrease in cell proliferation and viability; (2) necrotic and apoptotic cell death; (3) arrest in G2 checkpoint of cell cycle and (4) a decrease of mitotic index. Furthermore, we demonstrated that while quercetin promotes cancer regression it was able to protect the hippocampal organotypic cultures from ischemic damage. Taken together, our results suggest that quercetin induced selective growth inhibition and cell death in U138MG human glioma cell line, while exerting a cytoprotective effect in normal cell cultures, which is highly desirable for optimizing cancer therapy.

Results of our laboratory demonstrate that the extracellular purine metabolism is altered in glioma cell lines in relation to astrocytes, suggesting that changes in the purinergic system can be a characteristic of gliomas and may contribute to malignant phenotype present by this tumor. Therefore, the following step was to investigate the pattern of adenine secretion, the AMP extracellular metabolism and the action of quercetin in purinergic system. The glioma cell cultures secreted the following molecules: ATP, which was detected in greater levels than the others, ADP, AMP, adenosine and inosine. Extracellular AMP was efficiently metabolized by glioma cultures, demonstrating a very active ecto-5'-NT/CD73. In addition, quercetin was able to interact to purinergic system, by inhibiting non-competitively the ecto-5'-NT/CD73 activity and by modulating its expression. We suggest that ecto-5'-NT/CD73 activity inhibition may result in a decrease of extracellular adenosine production, a tumoral promoter. This effect could be related to the inhibition of tumoral progression induced by quercetin in this cell line.

Our data suggest that quercetin can be an important function on inhibition of glioma cell proliferation, interacting with different signaling pathways, including the purinergic system. In this way, this study opens new perspectives of flavonoid applications in both prevention and treatment of brain tumors.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Os Gliomas	6
1.1.1 Aspectos Gerais	6
1.1.2 Glioblastoma multiforme (GBM).....	9
1.1.3 Alterações genéticas dos gliomas	10
1.2 Sistema Purinérgico	12
1.2.1 Nucleotídeos Extracelulares	12
1.2.2 Purinoreceptores	13
1.2.3 A família das Ecto-Nucleotidases	14
1.2.4 Os tumores e as Ecto-Nucleotidases.....	17
1.3 Flavonóides.....	18
1.3.1 Aspectos Gerais	18
1.3.2 Quercetina: um dos principais flavonóides	19
1.3.3 Quercetina como agente antitumoral.....	22
2. OBJETIVOS	25
3. CAPÍTULOS – ARTIGOS CIENTÍFICOS	26
CAPÍTULO 1	26
ANTI-PROLIFERATIVE EFFECT OF QUERCETIN IN HUMAN U138MG GLIOMA CELL LINE	26
CAPÍTULO 2	36
ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 INHIBITION BY QUERCETIN: A POSSIBLE ANTI- PROLIFERATIVE ROLE IN HUMAN U138MG GLIOMA CELL LINE.....	36

4. DISCUSSÃO	66
5. CONCLUSÕES	76
GERAIS.....	76
ESPECÍFICAS.....	76
6. PERSPECTIVAS	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8. LISTA DE FIGURAS	92
9. LISTA DE TABELAS	93

LISTA DE ABREVIATURAS

- AKT- antiapoptotic facto, fator-antiapoptótico
- BAD- promotora de apoptose via inibição da BCL2
- BHE- barreira hematoencefálica
- BCL2- antagonista de morte celular
- CDK- cyclin dependent kinase, quinase ciclina-dependente
- CNTF- fator de crescimento neurotrófico ciliar
- Ecto-ADA- ecto-adenosina deaminase
- Ecto-5'-NT/ CD73- ecto 5'-nucleotidase/CD73
- E-NTPDase- ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
- EGFR- receptor do fator de crescimento epidermal
- ERK- extracellular signal-regulated kinase
- F-ATPase- F₀F₁ -ATPase
- FGF2- fator de crescimento derivado de fibroblasto 2
- FKHR-fator de transcrição “forkhead” (ativadora de morte celular)
- GBM- glioblastoma multiforme
- GPI- glicosil-fosfatidilinositol
- GSK3- glicogênio sintase 3 -quinase
- IC₅₀ – concentração de uma determinada droga capaz de causar 50% de inibição da atividade de uma enzima
- GSH- glutationa reduzida
- INK4A^{ARF}- gene supressor tumoral
- JNKK- c-Jun N-terminal quinase-quinase

JNK- c-Jun N-terminal quinase

MAPK- mitogen-activated protein kinase

MDM2- gene Murine Double Minute 2 (degrada p53)

MEK- membro da família da ERK quinase

MKK- membro da família da MAP quinase quinase

mTOR- mammalian target of rapamycin

NF- κ B- fator nuclear kappa

OGD- oxygen and glucose deprivation

PDGF- platelet-derived growth factor, fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGFR- platelet-derived growth factor receptor, receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

P1- receptor purinérgico metabotrópico para adenosina, dividido em quatro subtipos: A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃.

P2X- receptor purinérgico ionotrópico

P2Y- receptor purinérgico metabotrópico

P-ATPase- E₁-E₂- ATPases

PLC- fosfolipase C

PLA₂- fosfolipase A₂

PTEN- phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10

p14^{ARF}- controla a atividade do RB e da p53.

p16^{INK4A}- reguladora do ciclo celular via inibição das ciclinas quinase-dependentes 4 e 6; controla a atividade do RB e da p53.

p38- gene anti-apoptótico, pertencente a família das MAPK

p53- gene supressor tumoral

PDK- piruvato desidrogenase quinase, ativadora da AKT

PIP2- fosfatidilinositol 4,5-difosfato

PIP3- fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato

PI3K- fosfatidilinositol 3-quinase

PKC- proteína quinase C

RAC- RAC-alpha serine/threonine-protein kinase,

RAF- raf proto-oncogene serine/threonine protein kinase

Raft - domínio de membrana insolúvel a detergente

RAL- Ras-related GTPase

RAS- apresenta atividade GTPase e ligadora de GTP/GDP, envolvido no controle do crescimento celular.

RB- retinoblastoma

RT-PCR- transcriptase reversa- reação em cadeia da polimerase

SOS- proteína adaptadora

V-ATPase- vacuolar –ATPase

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os Gliomas

1.1.1 Aspectos Gerais

Gliomas são a forma mais comum e devastadora de tumores cerebrais primários, representando mais de 40% de todos os neoplasmas do Sistema Nervoso Central (Dai e Holland, 2001). O prognóstico para pacientes com esse tipo de tumor é ruim e, apesar de intensos esforços em desenvolver novas terapias, agentes efetivos ainda não estão disponíveis (Konopka e Bonni, 2003).

Os gliomas apresentam características morfológicas e expressão gênica similares à glia, astrócitos e oligodendrócitos, suportes funcionais dos neurônios (Chintala et al, 1999 e tabela 1). Ao longo dos anos, muitas investigações têm sido desenvolvidas com o objetivo de identificar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese dos gliomas. Recentemente, têm-se demonstrado que células-tronco podem estar envolvidas na gliomagenese. Células-tronco neuronais são reguladas pelas mesmas vias de sinalização que estão ativas em tumores cerebrais (Reya et al, 2001). Conseqüentemente, elas são capazes de exibir comportamento característico dos gliomas, incluindo elevada motilidade, associação com vasos sanguíneos, desenvolvimento de fenótipos antigênicos imaturos e ativação de vias sinalizadoras de crescimento e proliferação (Shoshan et al, 1999; Doetsch et al, 2002; Palmer et al, 2000 e tabela 2). A diversidade genética e celular encontrada em diferentes gliomas pode ser devido a trocas secundárias em subclones tumorais, mas isso somente é possível se o glioma for originário de uma célula tumoral pluripotente. Então, a incidência de gliomas compostos por mais de um tipo celular (como por exemplo, o oligoastrocitoma) provavelmente não é devido à transformação independente de duas

células diferenciadas, hipótese vigente até então, mas sim relacionada à transformação de um progenitor celular multipotente (Chekenya et al, 2002).

Table 1. Cell Types and Associated Tumors of the Central Nervous System.

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

Table 2. Characteristics Intrinsic to Neural Stem Cells and Gliomas.

High motility
Diversity of progeny
Robust proliferative potential
Association with blood vessels
Association with white-matter tracts
Immature expression profiles
Nestin expression
EGF-receptor expression
PTEN expression
Hedgehog pathway activity
Telomerase activity
Wnt pathway activity

Tabela 1. Tipos celulares do sistema nervoso central e tumores associados.

Tabela 2. Características intrínsecas às células tronco e aos gliomas.

Adaptado de Sanai et al, 2005.

Uma das características mais marcantes do glioma é o seu elevado grau de proliferação e invasibilidade. Como consequência, pacientes com esse tipo de tumor apresentam um grande comprometimento do tecido nervoso periférico ao tumor com o desenvolvimento de sintomas que incluem cefaléia, mudanças cognitivas, papiloedema e convulsões (Girolami et al, 2000). Gliomas são usualmente detectados por tomografia computadorizada e por ressonância magnética. O sistema de classificação de tumores cerebrais da Organização Mundial da Saúde (OMS) utiliza quatro graus para descrever os gliomas, baseados na malignidade celular, nas características invasivas e na capacidade de

desenvolver necrose (Chintala, 1999). Astrocitomas pilocíticos (grau I) são tumores relativamente benignos que geralmente ocorrem em crianças e adultos jovens (Duarte et al, 1994). Os astrocitomas de baixo grau (grau II) podem aparecer em qualquer região do sistema nervoso central e tendem a infiltrar-se difusamente no parênquima cerebral ao redor do tumor (Girolami et al, 2000). Os astrocitomas anaplásticos (grau III) são caracterizados por astrócitos fibrilares ou gemistocíticos, podendo progredir rapidamente a glioblastoma. Finalmente os glioblastomas multiformes (grau IV) são os mais encontrados na região frontotemporal, mas também podem afetar os lobos parietais, sendo os tumores cerebrais de maior malignidade (Dai e Holland, 2001). A sobrevida média dos pacientes com tumores cerebrais encontra-se sumarizada na Figura 1.

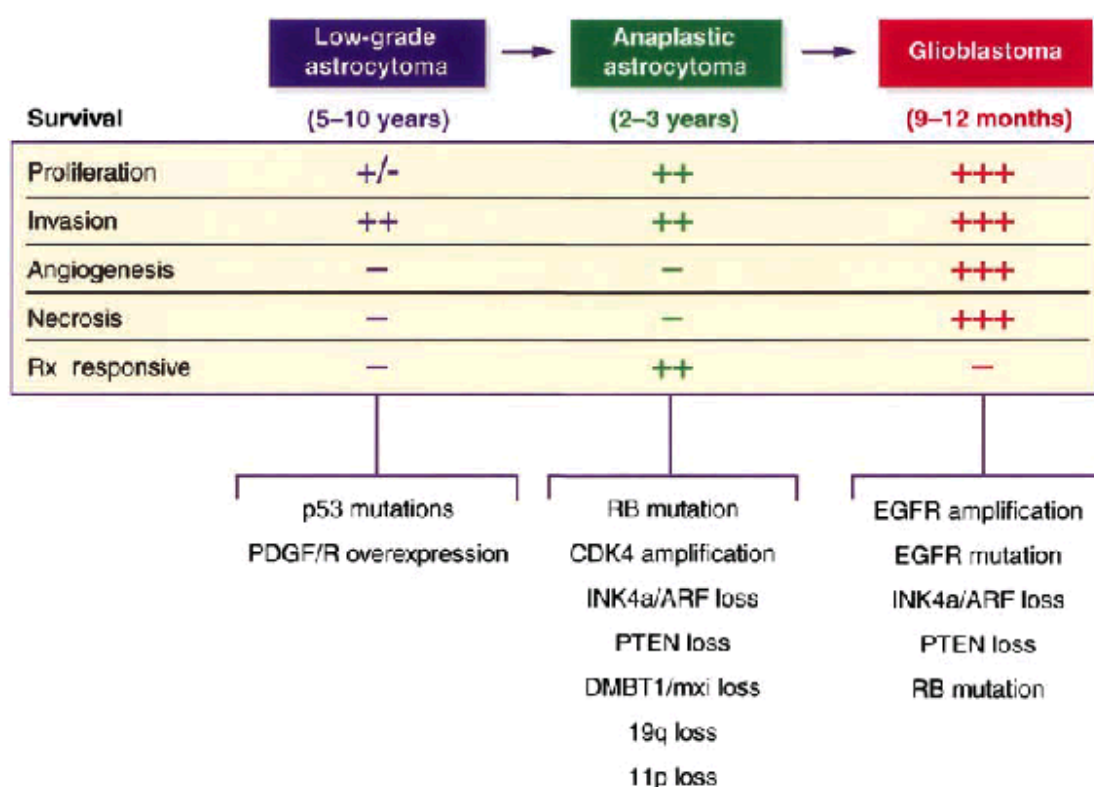


Figura 1. Relação entre sobrevivência média, características histológicas e maiores lesões genéticas associadas com cada tipo de tumor.

Adaptado de Maher et al. (2001).

1.1.2 Glioblastoma multiforme (GBM)

O glioblastoma multiforme é o tumor cerebral primário mais comum e letal (grau IV) (Laws e Shaffrey, 1999). Glioblastomas são quase sempre infiltrativos e comumente apresentam características multifocais (Dai e Holland, 2001). Tais tumores são formados por uma massa intraparenquimal heterogênea que evidenciam áreas de necrose e hemorragia. Microscopicamente, o tumor consiste em diferentes tipos celulares: células próprias do glioma, células endoteliais hiperproliferativas, macrófagos e células normais de áreas do cérebro que estão sendo invadidas pelo glioma. Entre as características histológicas mais comuns do GBM, incluem-se regiões de necrose rodeadas por células de arquitetura pseudopaliçada; vasos sanguíneos hipertrofiados no interior e em áreas adjacentes ao tumor; grande variabilidade de tamanho e formato de núcleo (pleiomorfismo nuclear). O GBM pode tanto ter origem *de novo*, como ser resultado da progressão de um glioma de baixo grau.

O tratamento inicial para esses tumores é a cirurgia, associada à radioterapia e seguida de quimioterapia, tendo esse último grande limitação devido às restrições impostas pela barreira hematoencefálica (Brandes et al, 2000). Além disso, o tratamento cirúrgico dos gliomas fica comprometido pela natureza invasiva dessas células tumorais, sendo a infiltração no tecido cerebral adjacente um fator limitante da ressecção cirúrgica (Grobben et al, 2002). Dessa forma, a recorrência do tumor é quase inevitável, uma vez que a remoção cirúrgica do tumor invariavelmente deixa no tecido normal uma população de células tumorais. Quase todos os pacientes com GBM morrem devido à sua patologia e apresentam sobrevida média de um ano (Dai e Holland, 2001).

1.1.3 Alterações genéticas dos gliomas

Alterações na expressão de muitos genes e anormalidades cromossômicas são comumente encontradas em gliomas e, na maioria dos casos, essas mutações estão correlacionadas com o grau clínico do tumor. Em gliomas de menor grau, diversos fatores de crescimento, tais como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) e fator de crescimento neurotrófico ciliar (CNTF), bem como os seus respectivos receptores geralmente estão super-expressos e a p53, proteína supressora tumoral, freqüentemente mutada. Gliomas de grau III (anaplásticos), adicionalmente apresentam um descompasso do ciclo celular, devido a deleção da INK4A, amplificação da ciclina dependente de kinase 4 (CDK4), ou perda do gene do retinoblastoma (RB). Os gliomas de grau IV (GBM) apresentam todas as alterações já citadas anteriormente, somadas a perda da região 10q22 – 25, porção cromossômica que carrega importantes genes supressores tumorais, entre os quais a PTEN (proteína fosfatase e homóloga a tensina). A perda da expressão da PTEN resulta em ativação da AKT, uma das vias centrais de sobrevivência celular, constitutivamente ativa (Holland, 2001). Tumores que expressam maiores níveis de PTEN estão correlacionados com um melhor prognóstico para os pacientes, o que sugere que a PTEN ocupa um papel decisivo na gliomagenese (Lin et al, 1998). A amplificação e ativação de mutações no gene que codifica o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), também têm sido observadas. Quase todas essas mutações resultam em desregulação da parada do ciclo celular. A soma dos efeitos provocados por essas alterações contribui para a biologia desses tumores (Holland, 2001). Figuras 2 e 3 apresentam as principais vias de transdução de sinal alteradas nos gliomas humanos.

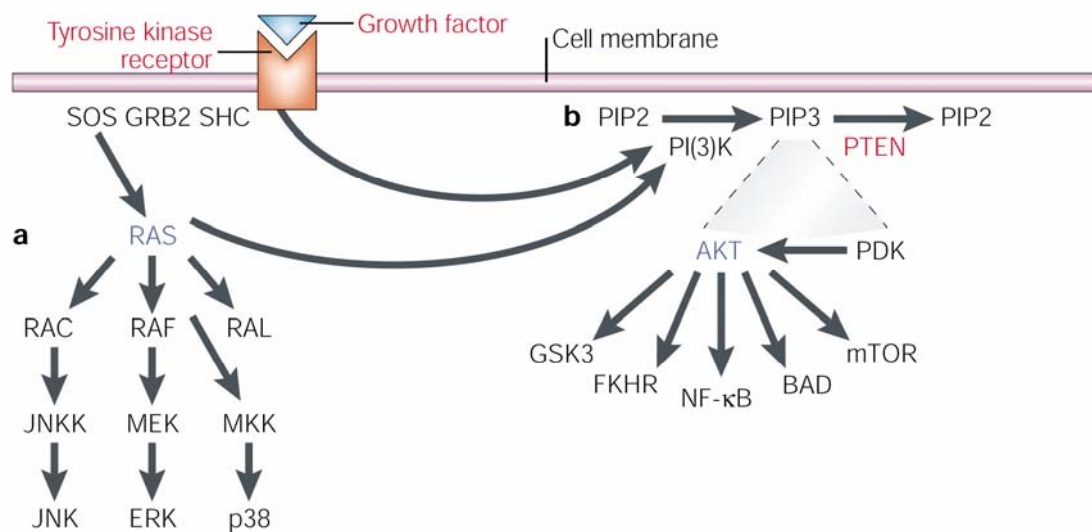


Figura 2. Vias de sinalização alteradas por mutações em gliomas humanos. (a) Vias de transdução de sinal da RAS e AKT e seus receptores tirosina kinase. (b) Ao interagirem com seus respectivos ligantes, esses receptores também ativam a PI3-K. Adaptado de Holland, 2001.

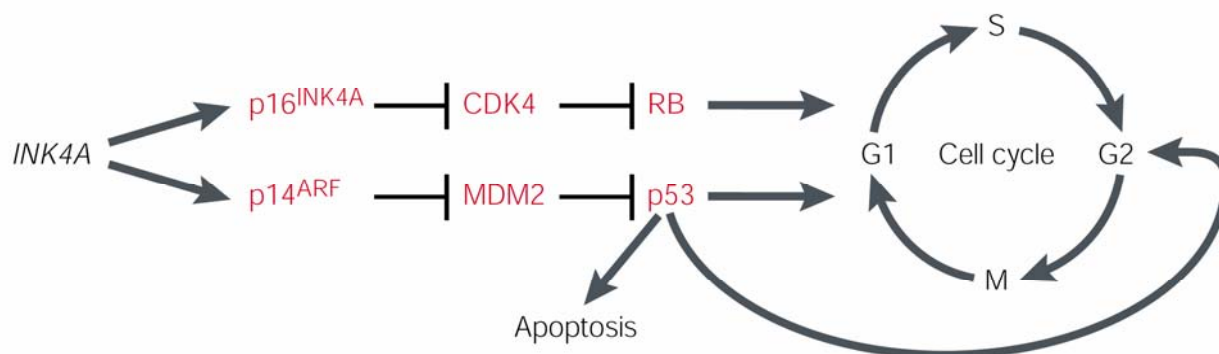


Figura 3. Vias de parada do ciclo celular controladas por INK4A gene. p16^{INK4A} e p14^{ARF} controlam a atividade do retinoblastoma (RB) e p53. Retinoblastoma promove parada no ciclo celular em G1. p53 promove parada no ciclo celular em G1 e G2 e também ativa apoptose. A perda da função do p53 promove instabilidade genômica. Genes marcados em vermelho estão frequentemente alterados em gliomas. Adaptado de Holland, 2001.

1.2 Sistema Purinérgico

1.2.1 Nucleotídeos Extracelulares

Apesar de tradicionalmente serem atribuídas às purinas estritamente ações intracelulares, tais moléculas são capazes de sinalizar no meio extracelular, uma variedade de efeitos biológicos no meio extracelular, incluindo neurotransmissão, neuromodulação, contração muscular, secreção, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dor, modulação da função cardíaca, entre outros (Burnstock, 2004). Além de exercerem papel como neurotransmissores, nucleotídeos e nucleosídeos purínicos podem atuar de diversas formas como agentes tróficos no SNC, induzindo trocas funcionais que modulam a diferenciação neuronal; a síntese e liberação de fatores tróficos; a neuritogênese e a potenciação da ação de fatores de crescimento sobre células alvo (Rathbone et al, 1999).

Apesar de muitas investigações, o exato mecanismo de liberação do ATP permanece pouco claro (Bodin e Burnstock, 2001). Fontes potenciais de purinas extracelulares no SNC incluem neurônios, glia, microglia, células endoteliais e sangue. O ATP pode ser armazenado em vesículas sinápticas e ser liberado por exocitose como um co-transmissor juntamente com outros neurotransmissores como, por exemplo, a acetilcolina (Zimmermann, 1994). Adicionalmente, o ATP também pode ser liberado a partir de dano celular. Uma vez liberados, os nucleotídeos interagem com receptores específicos e finalmente são hidrolisados por ecto-enzimas até os seus respectivos nucleosídeos. Por exemplo, ATP pode ser hidrolisado até adenosina, um importante neurotransmissor e neuromodulador (Zimmerman, 1994).

1.2.2 Purinoreceptores

Distintos purinoreceptores para ATP e adenosina, denominados de P1 e P2, respectivamente, foram originariamente identificados por Burnstock e colaboradores (Burnstock, 1976, 1978). Até o momento foram clonados e caracterizados 15 subtipos de receptores P2 (Burnstock, 2004) e 4 subtipos de receptores P1 (Fredholm et al, 2001). Os receptores purinérgicos são funcionalmente classificados como: 1) metabotrópicos: acoplados à proteína-G, os quais estão incluídos os receptores do tipo P1 (adenosina) e P2Y (ATP); 2) ionotrópicos: diretamente ligados a canais iônicos, os quais estão incluídos os receptores tipo P2X (ATP) (Abbracchio et al, 1994).

Os receptores metabotrópicos P1 (adenosina) são divididos em quatro subtipos A1, A2A, A2B e A3 (Abbracchio et al, 1994). Eles podem ser identificados pela distinta afinidade de ligação a agonistas e antagonistas e pela ativação de vias sinalizadoras acopladas à proteína-G (Palmer and Stiles, 1995). De forma geral, receptores A₁ são associados à inibição da adenil ciclase, ativação da fosfolipase C (PLC) e fosfolipase A₂ (PLA₂) e estão envolvidos na inibição da neurotransmissão excitatória (Caciagli et al., 1989). Receptores A₂ são acoplados à proteína-G estimulatória, gerando aumento dos níveis de AMPc intracelulares e, assim desencadeiam ações neuronais excitatórias (Fredholm et al, 2001). Foi demonstrado que receptores A₃ estão envolvidos na ativação da fosforilação da ERK 1/2 em astrócitos fetais humanos (Neary et al, 1998) e em células microgliais (Hammarberg et al, 2003). Adicionalmente, os receptores P1 podem modular vias de proteção e proliferação celular (A1, A2 e A3), bem como apoptose (A3) (Spychala, 2000; Latini e Pedata, 2001).

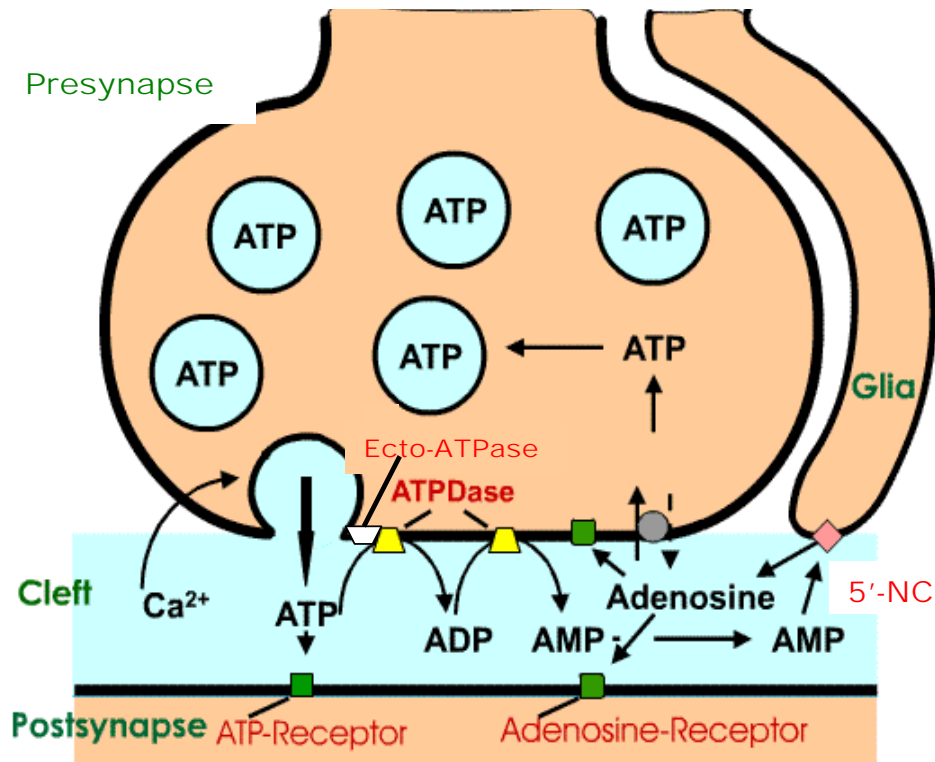
Os receptores P2 são divididos em duas classes: P2X, ligados a canais iônicos; e P2Y, acoplados à proteína-G. Os receptores P2X desencadeiam seus efeitos via abertura de

um canal iônico na membrana celular (Abbracchio et al, 1994), não parecendo haver o envolvimento nem de proteínas-G, tampouco de segundos-mensageiros intracelulares. O ATP é o principal agonista. Outros nucleotídeos (ADP, UTP, UDP) apresentam pouca ou nenhuma afinidade pelos receptores P2X (Idelson, 2001). Entre os receptores P2X, o subtipo P2X7 é funcionalmente distinto dos outros, devido a sua habilidade em formar poros na membrana. A ativação desse receptor aumenta a permeabilidade a ânions, cátions e a moléculas de até 900Da (Ballerini et al., 1995). A ativação desse receptor está relacionada com eventos de morte e proliferação celular (Adinolfi et al., 2005). Os receptores P2Y usualmente são acoplados a PLC e subsequentemente modulam os níveis de cálcio intracelular (Abbracchio et al, 1994; Harden et al., 1995). Assim, por exemplo, a estimulação do receptor P2Y em astrócitos pode ativar as MAPKs (Neary et al., 1996) estimulando vias relacionadas com proliferação e diferenciação celular.

1.2.3 A família das Ecto-Nucleotidases

Os eventos induzidos por nucleotídeos de adenina extracelulares são controlados pela ação de ecto-enzimas, as quais representam um importante sistema de modulação da neurotransmissão purinérgica. Assim, ao ser liberado ao meio extracelular, o ATP desencadeia seus efeitos via purinoreceptores, podendo ser removido pela ação conjunta de E-NTPDases e da ecto-5'-NT/CD73. Essas ecto-enzimas, através de reações sucessivas, hidrolisam nucleotídeos (como o ATP) até seus respectivos nucleosídeos (adenosina), constituindo uma cascata enzimática altamente eficiente, hábil em controlar a concentração e o tempo em que essas moléculas sinalizadoras permanecem no espaço extracelular (Zimmermann, 2001 e figura 4).

Figura 4. Funções do ATP liberado no terminal nervoso e sua completa hidrólise até adenosina no espaço extracelular.



(Adaptado de www.biozentrum.uni-frankfurt.de/prof/zimmermann).

Os membros da família E-NTPDase, previamente classificados como E-ATPases, constituem uma classe de ecto-enzimas ancoradas à membrana plasmática via domínios hidrofóbicos, com o sítio ativo voltado para o meio extracelular. Essas enzimas são caracterizadas pela sua capacidade em hidrolisar nucleotídeos tri- e difosfatados, dependência de cátions divalentes para exercer atividade catalítica, insensibilidade a inibidores clássicos de P-, F- e V-ATPases e presença de cinco regiões altamente conservadas, denominadas de regiões conservadas da apirase (ACR) (Plesner, 1995). Em mamíferos, já foram clonados e classificados 8 membros dessa família de ecto-enzimas,

nomeados NTPDase1-8, os quais apresentam diversidade de preferência por substrato e distribuição tecidual (Tabela 3).

Tabela 3. Nomenclatura e preferência de substratos dos membros da família E-NTPDase em vertebrados.

Nome Atual	Nomes previamente usados	Preferência de substrato
NTPDase 1	CD39, ecto-ATP difosfoidrolase, ecto-apirase, ecto-ATPDase	ATP=ADP (1:1)*
NTPDase 2	CD39L1, ecto-ATPase	ATP >>>>ADP (30:1)*
NTPDase 3	CD39L3, HB6	ATP>ADP (3:1)*
NTPDase 4	UDPase (hLALP70v), hLALP70	UDP>GDP,CDP
NTPDase 5	CD39L4, ER-UDPase	UDP>GDP,IDP>>>ADP, CDP
NTPDase 6	CD39L2	GDP>IDP>>UDP,CDP>>ADP
NTPDase 7	LALP1	UTP, GTP, CTP
NTPDase 8		ATP = ADP (2:1)*

As NTPDases de 1 a 4 e 8 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 próximo ao domínio N-terminal para formar uma proteína solúvel liberada. As NTPDases de 4 a 7 são localizadas intracelularmente.

Adaptado a partir de Zimmermann (2001). * Razão de hidrólise NTP: NDP. As NTPDases de 1 a 3 hidrolisam todos os outros nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, similarmente ao ATP e ADP.

A ecto-5'-NT/CD73 é um homodímero ligado a membrana plasmática por meio de uma âncora lipídica de GPI, o sítio catalítico é voltado para o meio extracelular, a atividade hidrolítica é potencializada por cátions divalentes e inibida por ADP, ATP e 5'- α,β -metileno-difosfato. Essa enzima catalisa a hidrólise de nucleosídeos 5'-monofosfatados (como o AMP) até os respectivos nucleosídeos, sendo enzima chave na via de degradação dos nucleotídeos e a principal fonte enzimática de adenosina no meio extracelular (Zimmermann, 1992). A adenosina, produto final da hidrólise do ATP, é um importante neuromodulador e neurotransmissor, desencadeando efeitos opostos aos do ATP (James and Richardson, 1993). Além da função catalítica de produção de adenosina extracelular, tem-se demonstrado que ecto-5'-NT/CD73 está envolvida em interações célula-célula /célula-matriz e em eventos de migração e adesão celular (Fastbom et al, 1987; Schoen et al 1988; Vogel et al, 1991).

1.2.4 Os tumores e as Ecto-Nucleotidases

A transformação de uma célula normal em um tumor maligno é um processo multifatorial que, adicional à modulação da expressão de genes que controlam proliferação/diferenciação celular, requer condições específicas que provenham suporte fisiológico para o desenvolvimento do tumor. Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram fortes evidências de que a sinalização purinérgica está envolvida no crescimento e na progressão dos gliomas: i) gliomas apresentam alterações no metabolismo extracelular de nucleotídeos, exibindo uma baixa atividade ATPásica e uma elevada atividade AMPásica, comportamento oposto aos astrócitos (Wink et al, 2003a); ii) ATP e adenosina extracelulares induzem estímulo proliferativo em diferentes culturas de gliomas (Morrone et al, 2003); iii) ao contrário do tecido cerebral normal, gliomas apresentam uma

clara resistência à morte induzida por concentrações citotóxicas de ATP (Morrone et al, 2005). Assim, a morte do tecido neuronal em torno do tumor pode resultar em liberação dos conteúdos intracelulares de ATP. Como o ATP é pobremente metabolizado pelo glioma, poderia ocorrer o acúmulo deste nucleotídeo na superfície tumoral, resultando em estímulo proliferativo para as células do glioma e mais citotoxicidade para o tecido normal. Além disso, a elevada atividade da ecto-5'-NT/CD73 encontrada em diferentes linhagens de gliomas humanos, pode estar envolvida em eventos de migração e adesão celular, importantes mecanismos de invasão tumoral (Dieckhoff et al, 1986) e em acúmulo de adenosina, molécula que potencialmente pode contribuir para a progressão tumoral (Spychala, 2000).

Dessa forma, alterações no metabolismo do ATP e dos seus metabólitos, podem ser uma característica desse tipo de tumor e possivelmente representam um importante mecanismo de invasão e proliferação. Interferências farmacológicas no sistema purinérgico capazes de reverter as alterações encontradas nessa via podem ser um potencial alvo para intervenções terapêuticas.

1.3 Flavonóides

1.3.1 Aspectos Gerais

Os flavonóides constituem-se no maior e mais importante grupo de compostos polifenólicos das plantas. Essas substâncias estão amplamente distribuídas em bebidas e comidas de origem vegetal, tais como: frutas, vegetais, vinho tinto e chá verde (Beecher et al, 2003). A estrutura molecular dos flavonóides consiste de dois anéis aromáticos (anéis A e B), ligados por uma ponte de 3 carbonos. De acordo com o estado de oxidação e a presença de determinados grupos funcionais, os flavonóides podem ser divididos em seis

subclasses: flavonas, flavanonas, flavanóis, flavonóis, isoflavonas e antocianidinas (Ross, et al 2002; Yang et al, 2001). Flavonóides têm sido apontados como agentes benéficos na prevenção e tratamento de diversas patologias (Rice-Evans, 2001; Havsteen, 2002), incluindo câncer (López-Lázaro, 2002; Galati et al 2000), doenças cardiovasculares (Ross e Kasum, 2002; Steinberg et al, 2003) e desordens neurodegenerativas (Schroeter et al, 2002; Inanami et al, 1998). Assim, uma vez que o consumo de flavonóides é seguro e ausente de efeitos adversos, um maior entendimento dos benefícios proporcionados por essas substâncias não somente levará à descoberta de novos fármacos, mas também influenciará nos hábitos da dieta humana e no consumo de bebidas.

1.3.2 Quercetina: um dos principais flavonóides

Entre os flavonóides, a quercetina (3, 3', 4', 5, 7- pentahydroxyflavona) é uma das substâncias mais estudadas (Williams et al, 2004 e figura 5). Numerosos experimentos têm reportado que a quercetina apresenta propriedades biológicas, farmacológicas e medicinais (Hollman e Katan, 1999; Inal e Kahraman, 2000). As principais fontes de quercetina da dieta são: alho, maçã e chá verde (Hertog et al, 1993). Além disso, o consumo de suplementos alimentares contendo quercetina está tornando-se cada vez mais comum (Weldin et al, 2003). Os flavonóides são extensivamente metabolizados *in vivo*, resultando em significantes alterações em seu estado redox. Após absorção no intestino delgado, a quercetina é metabolizada imediatamente por enzimas presentes nas células epiteliais e posteriormente pelo fígado, sendo seus principais metabólitos *in vivo*, 3'- *O*-metil quercetina, 4'-*O* -metil quercetina e quercetina- *O*- β- D-glucoronídeo. (Manach e Donovan, 2004), os quais também apresentam atividade biológica em humanos e animais (Spencer et al 2001; Spencer et al 2003a).

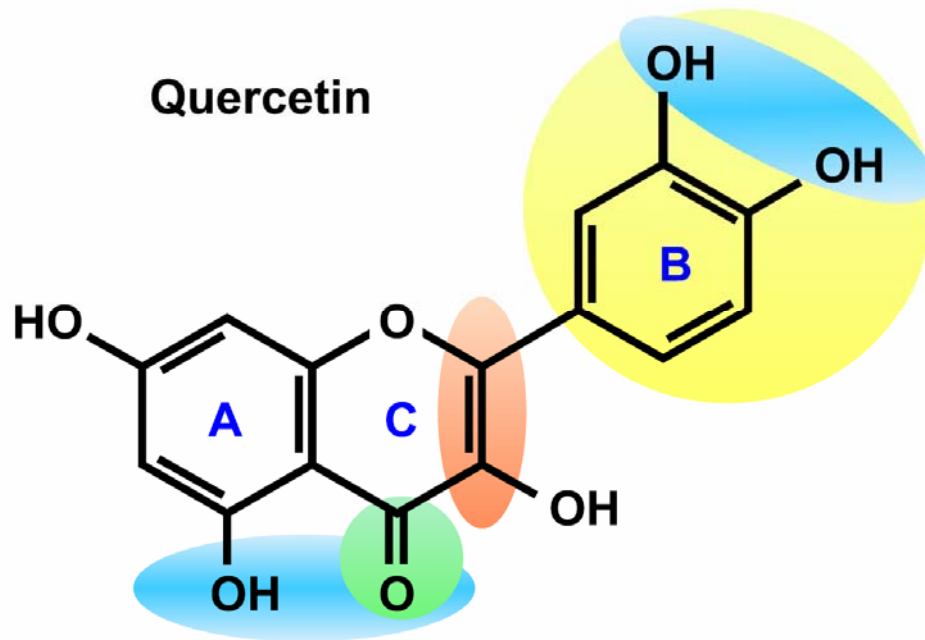


Figura 5. Estrutura do flavonol quercetina.

Destaque para as estruturas envolvidas na sua atividade farmacológica e antioxidante. Grupamento mais importante é o catecol (amarelo). Outros grupamentos importantes: presença de insaturação no anel C (vermelho), presença de função 4-oxo no anel C (verde). O grupo catecol e as outras funções (azul) possuem habilidade em quelar metais de transição, como o cobre e o ferro. Adaptado de Spencer et al, 2003a.

Apesar de alguns autores terem investigado a distribuição tecidual da quercetina, os dados são controversos e pouco conclusivos. Recentemente, um estudo realizado em animais demonstrou que a exposição prolongada à quercetina resulta em ampla distribuição tecidual do flavonóide e dos seus metabólitos (Boer et al, 2005). A captação dos flavonóides e dos seus metabólitos *in vivo* é dependente do tipo celular (Spencer et al, 2003a). Geralmente, os flavonóides podem ser conduzidos para três tipos de metabolismo intracelular: (1) conjugação com tiols, particularmente glutatona reduzida (GSH); (2) metabolismo oxidativo; e (3) metabolismo relacionado ao citocromo P450. Por exemplo, o

metabolismo intracelular da quercetina em fibroblastos envolve a formação de produtos de oxidação, a geração de 2'-glutathionil quercetina e a demetilação de formas *O*-metiladas da quercetina. O metabolismo intracelular da quercetina e algumas vias de sinalização ativadas encontram-se esquematizados na figura 6.

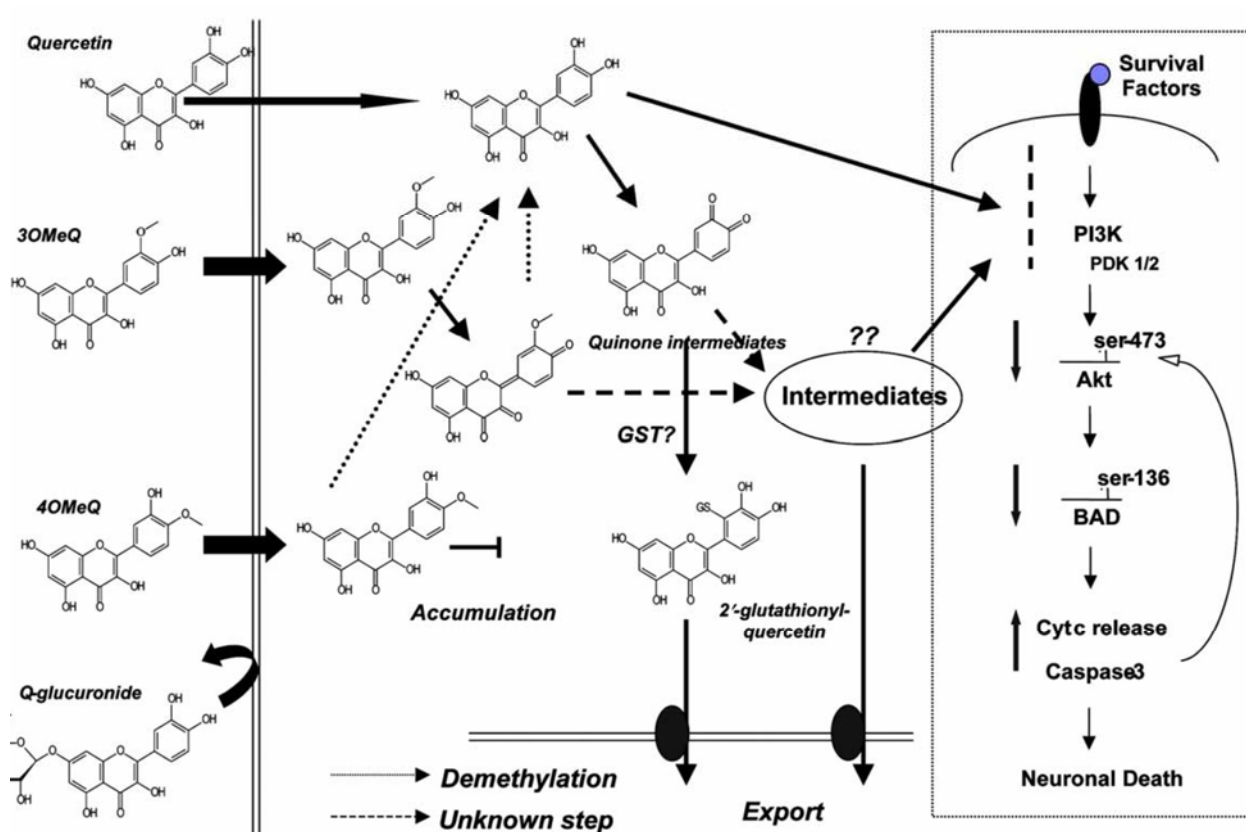


Figura 6. Sumário do metabolismo celular da quercetina e de seus metabólitos *O*-metilados em fibroblastos e possíveis vias de sinalização moduladas por essas substâncias.

Adaptado de Spencer et al, 2004.

1.3.3 Quercetina como agente antitumoral

Câncer é um problema de saúde pública crescente em todo o mundo. Recentes investigações estimam que mais de dois terços dos casos de câncer em humanos poderiam ser prevenidos através de modificação do estilo de vida. Substâncias derivadas de plantas, especialmente os flavonóides presentes na dieta, podem interferir em estágios específicos do processo carcinogênico. Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a ação anti-tumoral de tais substâncias, porém atenção especial tem sido dispensada para as cascatas de sinalização intracelular reguladoras do crescimento/ divisão celular. (Surh, 2003 e figura 7).

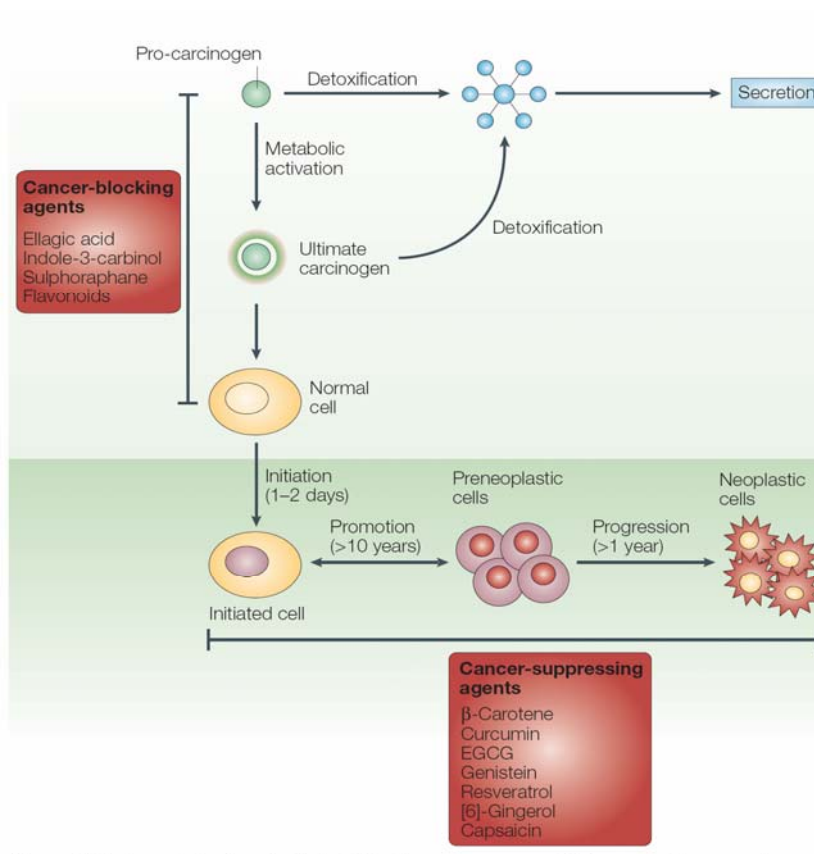


Figura 7. Fitoquímicos da dieta que bloqueiam ou suprimem múltiplos estágios da carcinogênese.

Adaptado de Surh et al, 1999.

Muitas ações biológicas dos flavonóides têm sido atribuídas as suas propriedades antioxidantes, tanto através da sua capacidade redutora *per se*, quanto na sua habilidade em influenciar o estado redox intracelular. Entretanto, estudos recentes demonstram que a atividade antioxidante apresentada por essas moléculas (Rice-Evans, 1996) não é a única explicação para os efeitos intracelulares encontrados (Spencer et al, 2001). Flavonóides podem exercer efeitos modulatórios nas células por meio de ações seletivas em uma variedade de proteínas kinases e lipídeos kinases, tais como fosfatidilinositol- 3- kinase (PI3K), AKT, tyrosina kinases, proteína kinase C (PKC) e MAP kinases (Schroeter et al, 2002; Kong et al, 2000; Matter et al, 1992; Vlahos et al, 1994). Ações inibitórias ou estimulatórias dessas vias afetam profundamente a função celular por alterar o estado de fosforilação de moléculas alvo e/ou por modular a expressão gênica celular. Apesar do flavonol quercetina ser um dos flavonóides mais estudados, seu mecanismo de ação permanece pouco claro. A quercetina apresenta um leque de propriedades farmacológicas, entre os quais estão incluídos efeitos antiproliferativos seletivos (Csokay et al, 1997) e morte celular por meio de mecanismo predominantemente indutor de apoptose em linhagens de células tumorais, mas não em células normais (Wei et al, 1994). Os efeitos antiproliferativos da quercetina podem ser exercidos via indução de parada do ciclo celular na fase G1 (Yoshida et al, 1992), pela interação com proteínas reguladoras do ciclo celular, tais como ciclina D1 e CDK-4 (Ma et al, 2004). Além disso, a quercetina pode interagir diretamente com a mitocôndria, controlando a liberação do citocromo *c* durante estágios iniciais da apoptose (Green e Reed, 1998), ou modulando fatores pro-apoptóticos associados à mitocôndria (Goyal, 2001). Além disso, esse flavonóide é um potencial inibidor da PI3K, uma das vias centrais de sobrevivência celular (Datta et al, 1999). Essa aparente falta de seletividade em interagir com distintas vias intracelulares se deve à

capacidade dos flavonóides em se ligar aos sítios de ligação do ATP dessas cinases (Conseil et al, 1998). Dessa forma, a capacidade da quercetina em prevenir e/ou retardar a progressão tumoral é resultado da modulação de várias vias relacionadas com crescimento e proliferação celular, o que é altamente desejável na otimização da terapia anti-tumoral.

2. OBJETIVOS

Este estudo será apresentado na forma de capítulos, constituído por artigos científicos que visam cumprir os seguintes objetivos:

- Investigar a ação antiproliferativa do flavonóide quercetina sobre culturas de linhagem de células de glioma humano U138MG, tentando elucidar as vias celulares envolvidas (Capítulo 1).
- Avaliar a ação do flavonóide quercetina (*in vitro* e em tratamento durante o período da cultura celular) sobre a atividade e a expressão da ecto-5'-nucleotidase/CD73 em linhagem de glioma humano U138MG (Capítulo 2).

3. CAPÍTULOS – ARTIGOS CIENTÍFICOS

CAPÍTULO 1

ANTI-PROLIFERATIVE EFFECT OF QUERCETIN IN HUMAN U138MG GLIOMA CELL LINE

Artigo aceito para publicação no periódico Anti-Cancer Drugs

CAPÍTULO 2

ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 INHIBITION BY QUERCETIN: A POSSIBLE ANTI- PROLIFERATIVE ROLE IN HUMAN U138MG GLIOMA CELL LINE

Artigo a ser submetido ao Periódico Archives of Biochemistry and Biophysics

ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 INHIBITION BY QUERCETIN: A POSSIBLE ANTI-
PROLIFERATIVE ROLE IN HUMAN U138MG GLIOMA CELL LINE

Running head: Quercetin inhibits ecto-5'-nucleotidase/CD73 in human U138MG glioma
cell

Elizandra Braganhol¹, Alessandra S.K. Tamajusuku¹, Márcia R. Wink² and Ana M.O.
Battastini^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

²Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil.

*Corresponding author: Dr. A.M.O. Battastini

Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600-anexo

CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, BRASIL

FONE: +55 51 3316 5554

FAX +55 51 3316 5535

e-mail: abattastini@terra.com.br

Subject Area: Cell Biochemistry

ABSTRACT

Gliomas are the most malignant of the primary brain tumors. Nucleotides represent an important class of extracellular signaling molecules. ATP and adenosine can stimulate cell proliferation in glioma cultures. The events induced by extracellular adenine nucleotides are controlled by the action of ecto-nucleotidases. Quercetin may play a beneficial role by preventing or inhibiting tumorigenesis. Considering that the purinergic signaling promotes glioma proliferation and the anti-proliferative actions of quercetin in tumoral cells, the aim of this study was evaluated the effect of quercetin on purinergic system in human U138MG glioma cell line. Glioma cells were able to secrete adenine nucleotides. Extracellular AMP was efficiently metabolized by glioma culture, indicating a very active ecto-5'-NT/CD73. Additionally, quercetin interacted with purinergic system, by inhibiting non-competitively the ecto-5'-NT/CD73 activity and by modulating its expression. We suggest that ecto-5'-NT/CD73 activity inhibition may result in a decrease of extracellular adenosine production and, consequently, inhibition of tumor progression.

Key words: glioma, quercetin, ecto-5'-NT/CD73, ATP, AMP, adenosine, cell proliferation, purinergic signaling.

INTRODUCTION

Astroglial cells perform a variety of roles in the nervous system, including neurotransmitter homeostasis, growth factor synthesis and support of the functions of neurons in the brain [1, 2]. Malignant gliomas are the most common primary tumors in the brain and have characteristics similar to glial cells. Because of the high invasiveness and the capacity to infiltrate diffusely into regions of normal brain, patients with this kind of tumor have a poor prognosis and the mean survival is about 12 months. Despite intense efforts to develop treatments, effective agents are still not available [3].

Nucleotides represent an important and ubiquitous class of extracellular molecules that interact with specific receptors, activating signaling pathways that are crucial for normal functioning of the nervous system [4]. Extracellular nucleotides and nucleosides have been implicated as trophic agents on glial cells that induce alterations in cell metabolism, structure and function of neurons and astrocytes [5]. ATP is a fast excitatory synaptic transmitter, acting via metabotropic (P2Y) and ionotropic (P2X) receptors [4, 6]. This signalling molecule can stimulate mitogenesis, cell proliferation [7, 8] and promotes cytotoxic effects on neuronal tissue whereas stimulates the glioma cell proliferation [9]. Adenosine, the end product of ATP hydrolysis, is one of factors that can contribute to tumor progression. Adenosine receptors are reported as mediators of cell proliferation, angiogenesis and may suppress the anticancer immune response [10]. The events induced by extracellular adenine nucleotides are controlled by the action of ecto-nucleotidases (E-NTPDase and ecto-5'-nucleotidase/CD73), that hydrolyze ATP into adenosine in the extracellular space. The molecular properties, functional roles and nomenclature of nucleotidases have been reviewed [6].

Ecto-5'-nucleotidase/ CD73 (ecto-5'-NT/CD73) is a homodimer linked to plasma membrane through a glycosyl- phosphatidylinositol lipid anchor, with its catalytic site exposed to the extracellular space. It catalyses the hydrolysis of extracellular nucleosides monophosphates (AMP) to adenosine, being the best-characterized enzymatic source of adenosine [11]. Ecto-5'-NT/CD73 is expressed in many tissues [11] and is densely distributed in the membranes of glioblastoma cells [12]. The partial co-localization of this enzyme with adenosine receptors in the brain [13] suggest that ecto-5'-NT/CD73 has functional properties other than its catalytic activity. In fact, evidence pointed to the role of ecto-5'-NT/CD73 in the control of cell growth, maturation, differentiation, cell-cell and cell-matrix interactions [14, 15, 16]. In addition, involvement of ecto-5'-NT/CD73 in drug resistance and tumor-promoting functions has been proposed [10,17].

Recent epidemiological and dietary intervention studies in animals and humans have suggested that diet-derived phenolics, in particular the flavonoids, may play a beneficial role in inhibiting, reversing or retarding tumorigenesis [18]. Among the flavonoids, quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroksyflavon) is one of the most widespread in the plant kingdom and occurs naturally in a wide range of fruits and vegetables [19]. Since quercetin has the potential to bind to the ATP-binding sites of a large number of proteins [20], this flavonoid possess a broad range of pharmacological properties which include inhibition of mammalian enzyme systems. Studies pointed that quercetin and other polyphenolic substances can inhibit the ecto-5'-NT/CD73 activity [21]. These actions are likely to affect the cell function by altering the neurotransmitter levels, e. g. adenosine, the phosphorylation state of target molecules and/ or by modulating gene expression [22].

Therefore, considering that: i) adenine nucleotides and nucleosides are involved in cell proliferation pathways; ii) studies from our laboratory have showed that glioma cells

present an altered extracellular adenine nucleotides catabolism when compared to astrocyte cultures [23], which may be associated with malignant transformation of glioma cells and iii) quercetin possess antitumoral activity and inhibit ecto-5'-NT/CD73 from a variety of sources, we sought to investigate the effect of quercetin on the ecto-5'-NT/CD73 activity and expression in human U138MG glioma cell line. The possible relationship between the inhibition of this enzyme and the anti-proliferative action of this flavonoid was further discussed.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

U138MG human glioma cell line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Cells were grown in culture flasks in Dulbecco's Modidief Eagle's medium (DMEM)/ 15% fetal bovine serum (FBS) and seeded in 24 multiwell plates (TTP plates) at densities of 1×10^4 cells/ well in 500 μ L medium per well. Cell cultures were maintained in 5% CO₂/ 95% air at 37°C and allowed to grow to confluence.

Quercetin Exposure

Glioma cells were seeded at 1×10^4 cells/ well in DMEM/ 15% FBS in 24 multiwell plates. To *in vitro* experiments, the cultures were exposed to quercetin (Sigma) in the incubation medium at concentrations: 0.001 to 500 μ M diluted in DMSO. To treatment experiments, the cultures were exposed to quercetin (10, 30 and 100 μ M) in the culture

medium for different times (24, 48 and 72h). Control cultures were performed with DMSO (0.5% final concentration) in absence of quercetin.

Analysis of cell secretion purines and extracellular AMP metabolism by HPLC

After the cell confluence, the cellular monolayers were washed three times with incubation medium containing 2mM MgCl₂, 120mM NaCl, 5mM KCl, 10mM glucose, 20mM Hepes, pH 7.4. The reaction was started by adding AMP at final concentration of 100 μM. The final volume was 300μL and the incubation was carried out at 37°C. After different times of incubation (0, 10, 30, 60 and 90 min), the supernatant was taken and maintained on ice. Separation of the degradation products was carried out from 40 μL of incubation sample, with a reversed-phase column (Supelcosil LC-18, 25 cm × 4.6 mm, Supelco) in a Shimadzu Instruments Liquid Chromatograph. The elution was carried out applying a linear gradient from 100% of solvent A (60mM KH₂PO₄ and 5mM of tetrabutylammonium phosphate, pH 6.0) to 100% of solvent B (70%100mM KH₂PO₄ and 5mM of tetrabutylammonium phosphate, pH 6.0, plus 30%acetonitrile) over a 35 min period (flow rate at 1.2 ml/min). The amounts of purines were measured by absorption at 254 nm. The retention time of standards was used as parameter for identification and quantification. Purine concentrations are expressed as nmol/mg (mean ± S.D.). All incubations were carried out in triplicate and the controls to correct for non-enzymatic hydrolysis of nucleotides were done by measuring the peaks presents into the same reaction medium incubated without cells. Controls for cellular purine secretion were done incubating the cells into the same reaction medium in absence of substrate for 90 min and the purine concentrations are expressed as μM (mean ± S.D.).

Ecto-5'-nucleotidase/CD73 assay

To determine the AMP hydrolysis, the U138MG 24 multiwell plates were washed three times with incubation medium in absence of nucleotides. The reaction was started by the addition of 200 μ L the incubation medium containing 2 mM $MgCl_2$, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM Hepes, pH 7.4 and 2 mM of AMP at 37°C, except in experiments for the determination of K_m values for AMP hydrolysis, where AMP concentrations ranged from 0.1 to 2 mM. After 10 min of incubation, the reaction was stopped by taking an aliquot of the incubation medium and transferred to a tube containing TCA (5% w/v) previously placed on ice. The release of inorganic phosphate (Pi) was measured by the malachite green method [24], using KH_2PO_4 as a Pi standard. The non-enzymatic Pi released from nucleotide into assay medium without cells and Pi released from cells incubated without nucleotide was subtracted from the total Pi released during incubation, giving net values for enzymatic activity. All samples were run in triplicate. Specific activity is expressed as nmol Pi released/ min/ mg of protein.

RT-PCR analysis

Total RNA from U138MG glioma cell line culture, with or without quercetin treatment, was isolated with Trizol LS reagent (Life Technologies) in accordance with the manufacturer's instructions. The cDNA species were synthesised with M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) from 5 μ g total RNA in a final volume of 25 μ l with a random hexamer primer in accordance to the manufacturer's instructions. 1 μ l of cDNA was used as a template for PCR in a total volume of 20 μ l using a concentration of 0.5 μ M of each primer, specific for ecto-5'-nucleotidase/CD73, indicated below, 50 μ M of dNTP and 1 U

Taq polymerase (CenBiot-UFRGS) in the supplied reaction buffer. As a control for cDNA synthesis, GAPDH PCR was performed. The annealing temperatures were: ecto- 5'-nucleotidase/CD73, 52°C; GAPDH, 50°C. The PCR cycling conditions were as follows: 1 min at 95°C, 1 min at 94°C, 1 min at annealing temperature, 1 min at 72°C. All PCRs were carried out for 35 cycles and included a final 10 min extension at 72°C. 10 µl of the PCR reaction was analysed on a 1.0 % agarose gel. The following set of primers were used: for ecto- 5'-nucleotidase/CD73: 5'GAT CGA GCC ACT CCT CAA A 3' and 5'GCC CAT CAT CAG AAG TGA C3' (amplification product: 437 bp) and for GAPDH: 5'CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC3' and 5'CCA TGG AGA AGG CTG GGG 3' (amplification product: 195 bp). Oligonucleotides were obtained from Invitrogen. Negative controls were performed with templates substituted by DNase, RNase free distilled water for each PCR reaction. Ecto-5'-nucleotidase mRNA expression was determined as the ratio of the ecto-5'-nucleotidase to GAPDH band density.

Protein determination

Cells in the 24 multiwell plates were dried and solubilized with 100 µL of NaOH 1N and frozen overnight. Then, an aliquot was taken and the protein was measured by the Coomassie blue method (25), using bovine serum albumin as standard.

Statistical Analysis

All results are presented as means \pm SD. Data were analyzed by one way ANOVA, followed by Tukey's test. P values <0.05 were taken to indicate statistical significance.

RESULTS

Adenine nucleotide/nucleoside secretion by U138MG glioma cells

ATP and adenosine can be released to extracellular milieu under pathophysiological conditions such as hypoxia, mechanical and osmotic strain as well as following cytolysis [26]. Thus, to evaluate the adenine nucleotide/nucleoside secretion, U138MG glioma cells grown to confluence, were incubated as described in materials and methods and the extracellular nucleotide/nucleoside levels were determined by HPLC analysis (fig. 1). Under our experimental conditions, glioma cells released significant concentrations of adenine nucleotide/nucleoside to extracellular medium: ATP ($6,46 \pm 1,23 \mu\text{M}$); ADP ($0,161 \pm 0,112 \mu\text{M}$); AMP ($0,433 \pm 0,054 \mu\text{M}$); adenosine ($0,8505 \pm 0,305 \mu\text{M}$) and inosine ($0,8507 \pm 0,129 \mu\text{M}$). Cell secretion was apparently not due to membrane rupture, since glioma cells presented absence of lactate dehydrogenase activity (data not shown). The nucleotides/nucleosides released to the extracellular medium may stimulate purinergic receptors in autocrine and paracrine manner and activate downstream signalling cascades responsible for a variety of action, such as effects related to cell proliferation and invasion [27].

Analysis of extracellular AMP metabolism

Studies from our laboratory have showed that glioma cells present an altered extracellular adenine nucleotides catabolism when compared to astrocyte cultures, where the increased ecto-5'-NT/CD73 activity is a peculiar characteristic [23]. Therefore, the extracellular products of AMP hydrolysis from U138MG glioma cells were analyzed by HPLC (fig. 2). In agreement with the results obtained with the AMPase activity measured by Pi released, the extracellular AMP was efficiently metabolized by glioma culture.

Within 60 min, virtually all the extracellular AMP was metabolized in the presence of intact glioma cells with a subsequent adenosine and inosine production. In contrast to astrocyte cultures, where it was not observed any adenosine accumulation [28], the glioma cells presented a distinct pattern. At the end of incubation time (90 min), the compounds detected in the incubation medium of glioma cells were adenosine ($167,80 \pm 30,03$ nmol/mg of protein) and inosine ($92,94 \pm 25$ nmol/mg of protein). As shown in fig. 2, only a part of adenosine generated by AMP hydrolysis accumulate in extracellular medium, suggesting that a portion can be converted to inosine by ecto-adenosine deaminase or uptake by a bi-directional nucleoside transport process, which may be of further importance as salvage of extracellular nucleosides for intracellular de novo synthesis of nucleotides, such as ATP [29]. In addition, the adenosine accumulation found could result in a proliferative advantage of this tumor cell.

Quercetin *in vitro* inhibited ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity on U138MG glioma

Biochemical investigations have shown that quercetin inhibit a variety of enzyme systems, including the ecto-5'-NT/CD73 [21]. Since U138MG glioma cells presented alterations in AMP catabolism and this change appears to be involved in the malignant phenotype of tumor cells, we attempt to verify whether quercetin was able to inhibit the ecto-5'-NT/CD73 activity. Glioma cell cultures were exposed *in vitro* to quercetin concentration curve (10 to 5×10^5 nM) and the AMP hydrolysis was evaluated (fig. 3). The inhibitory effect of quercetin on ecto-5'-NT/CD73 activity was dose dependent and initialized at low concentrations of this flavonoid (10 μ M). The ranking of ecto-5'-NT/CD73 activities was: 82.2 ± 6.7 (control cells) and 56.4 ± 5.1 ; 44.8 ± 5.6 ; 24.0 ± 2.5 nmol Pi/ min/ mg of protein for 10, 100 and 500 μ M of quercetin respectively. The IC_{50}

value for quercetin was determined with 45.3 μM . To further elucidate the mechanism of ecto-5'-NT/CD73 inhibition, kinetic analysis of AMP hydrolysis was conducted in absence (control cultures) and in presence of quercetin (100 μM) (fig. 4). Statistical analysis revealed that quercetin decreased the maximum hydrolysis rate (V_{max}) of ecto-5'-NT/CD73 as compared with control cultures (88.3 ± 9.8 vs 31.0 ± 5.4 nmol Pi/ min/ mg of protein) without any modification of the enzyme affinity ($K_m \sim 182 \pm 50$ μM and 140 ± 40 μM for control and quercetin exposed cultures, respectively), characterizing quercetin as a non-competitive inhibitor.

Quercetin treatment decreased the ecto-5'-NT/CD73 activity on U138MG glioma

Many studies have been report the actions of flavonoid quercetin on pharmacological activity at receptors, enzymes and transcription factors. Therefore, to evaluate the effect of quercetin treatment on ecto-5'-NT/CD73 activity, glioma cells were treated with quercetin (10, 30 and 100 μM) in the culture medium for different times (24, 48 and 72h) and then the enzymatic assay was performed as described in materials and methods (Fig. 5). Ecto-5'-NT/CD73 activity inhibition was detected at dose of 30 and 100 μM after 72 h of quercetin exposure (61.0 ± 10 control activity; 42.9 ± 7.8 and 45.0 ± 6.3 nmol Pi/ min/ mg of protein, respectively for quercetin 30 and 100 μM treatment). Quercetin exposure for 24 and 48 h was not able to induce AMP hydrolysis inhibition (data not shown).

Decrease of ecto-5'-NT/CD73 mRNA expression by quercetin

Next, we wanted to determine whether decrease in ecto-5'-NT/CD73 activity was mediated by decrease in CD73 RNA expression. U138MG glioma cells (control and treated) revealed specific signal (437 bp fragment) corresponding to mRNA for ecto-5-

nucleotidase/CD73 (Fig. 6). RT-PCR analysis revealed decrease of CD73 mRNA levels after 72 h exposure to quercetin 30 and 100 μ M (3.0 and 7.0- fold decrease, respectively, compared with untreated cells after normalization to GAPDH). These results support the hypothesis that the reduce in ecto-5'-NT/CD73 activity is related to a down regulation of the CD73 mRNA expression.

DISCUSSION

Gliomas are the most malignant of the primary brain tumors and are almost always fatal [3]. The transformation of a normal cell to a malignant tumor is a multifactorial process that, in addition to modulation in gene expression that control the cell proliferation and differentiation events, requires specific conditions that provide a physiological support to tumor development. Extracellular ATP and adenosine is thought to potentially contributing to tumor growth. Accumulating evidence suggests that the purinergic signaling is involved in growth and progression of glioma cells. First, we have demonstrated that glioma cell lines have altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism, presenting low rates of extracellular ATP hydrolysis and high rates of extracellular AMP hydrolysis when compared to astrocytes [23]. Second, the influence of these signalling adenine nucleotides on the proliferation induction in diverse human glioma cell lines was demonstrated [30]. Finally, glioma cells present a clear resistance to death induced by cytotoxic concentrations of ATP when compared with normal brain tissue [9]. Therefore, we hypothesized that changes in the ATP degradation could be a characteristic of this kind of tumor and possibly represent an important proliferation and invasion mechanism. Pharmacological interference in the purinergic system that reverses the alterations found in this pathway may be a potential target to therapeutic interventions. In this way, the flavonoid quercetin, which

present abroad pharmacological actions and can potentially inhibit ecto-5'-NT/CD73, seems to be a good candidate to treatment of tumors that present alterations in nucleotide catabolism, specially in AMP hydrolysis.

Previous studies have shown that adenine nucleotides and nucleosides can be released under physiological and pathological conditions, modulating a variety of effects [26]. We report that confluent cultures of U138MG glioma released detectable amounts of ATP, ADP, AMP, adenosine and inosine. The ATP concentration in the extracellular medium was higher than the others molecules analyzed, probably is a reflex of its poor hydrolysis by glioma cells and potentially may to result an increase of P2 receptors activation with subsequent effects in tumor proliferation and cell death of normal tissue around of tumor. The concentration of adenosine in the extracellular space of glioma (<1.0 μM) is sufficient to activate the A_1 and A_{2a} receptors [31], which are related with cytoprotection and cell proliferation effects [32-34]. Adenosine can be released through equilibrative nucleoside transporters or generated extracellularly from AMP by ecto-5'-NT/CD73 activity, enzyme highly active in glioma cells.

Previous studies have shown that ecto-5'-NT/CD73 activity was increased in glioma cell lines when compared to astrocytes. However, the fate of nucleosides, specially adenosine, generated by AMP hydrolysis remains unclear. The analysis of AMP extracellular demonstrated that it is completely hydrolyzed by glioma cells. In contrast to astrocyte cultures, where the adenosine generated by ecto-5'-NT/CD73 activity is efficiently retired of extracellular space [28], in glioma cultures adenosine and inosine accumulates in the extracellular medium, indicating one more difference in purinergic metabolism between normal and tumoral cells. Adenosine generated by glioma cells can be directed to following pathways: (i) interaction to its plasma membrane receptors (P1),

eliciting several actions, such as, proliferative and cytoprotective effects; (ii) inosine formation by adenosine deaminase activity or (iii) re-enters the cell and phosphorylation back to into ATP, a critical step in maintaining the pools of ATP available to sustain vital functions, which ecto-5'-NT/CD73 activity was directly involved [17]. Moreover, there were studies demonstrating that increased ecto-5'-NT/CD73 protein expression in cell lines serves as a required accessory molecule in resistance mediated by ATP-dependent mechanisms and that the growth-sustaining nucleosides are provided by this salvage pathway [17].

Flavonoids are very potent signaling substances. They produce anti-proliferative effects, induce cell death via apoptosis, and regulate many enzymatic systems [22]. Therefore, the modulatory effect of quercetin on ecto-5'-NT/CD73, an enzyme altered in U138MG glioma cells, was evaluated. In vitro experiments demonstrated that low doses of quercetin was able to inhibit the AMP hydrolysis, with $IC_{50} = 45.3 \mu\text{M}$. Kinetic enzymatic experiments revealed that quercetin decreased the maximum hydrolysis rate (V_{max}), whereas the K_m value was not altered, characterizing this flavonoid as a non-competitive inhibitor. Since detergent-insoluble membrane domains (rafts) are enriched by ecto-5'-NT/CD73 [35] and that the polyphenols interact with lipid rafts [36], we could speculate that changes of ecto-5'-NT/CD73 catalytic activity might be due to the disruption of its interaction with membrane rafts. However, additional experiments should be performed to elucidate this hypothesis.

In addition to in vitro experiments, we evaluated the effect of quercetin treatment in glioma culture. Quercetin (30 and 100 μM) inhibited the ecto-5'-NT/CD73 activity after 72 h of exposure. Since quercetin potentially can induce gene transcription, we investigated whether the decrease of AMP hydrolysis was consequence of a negative modulation of

ecto-5'-NT/CD73 mRNA levels. In fact, quercetin (30 and 100 μ M) exposure decreased the ecto-5'-NT/CD73 expression in 3.0 and 7.0- fold, respectively, when compared to U138MG control cultures. Although ecto-5'-NT/CD73 have been extensively characterized [11], very few data are available concerning a possible regulation by polyphenol substances. There is an increasing amount of evidence for the modulatory role of PKC-mediated ecto-5'-NT/CD73 activity in ischemia, regeneration and repair, glioma cell proliferation and a possible invasion promoting feature of the ecto-enzyme [37]. Quercetin have been reported to have inhibitory activity at a number of protein kinases, such as PKC. This inhibition is mediated via the binding of polyphenols to the ATP binding site, which result in structural changes of these proteins, leading to inactivity [38]. Therefore, the decrease of ecto-5'-NT/CD73 expression could be correlated with the inhibition of PKC pathway by quercetin. However, additional investigations should be performed to better elucidate the signaling pathway involved in this inhibitory effect.

In summary, quercetin efficiently inhibited the ecto-5'-NT/CD73 activity and modulated the enzyme expression. This enzyme is the major responsible to extracellular adenosine generation and might therefore modulate the glioma cell signaling. The AMP hydrolysis inhibition could result in a decrease of extracellular adenosine and an increased in AMP levels. Since extracellular adenosine triggers a proliferation signal, whereas extracellular AMP elicits the opposite effect [39], the resultant effect could be a decrease of tumor progression. Moreover, ecto-5'-NT/CD73 is a linker protein involved in cell motility and its activity and expression was related to process of maturation, migration and growth in numerous tumor cells [40]. So, the quercetin inhibitory effect on this protein could prevent the tumor migration and invasion. Additional investigations are necessary to

elucidate whether the inhibition of this enzyme is related with the anti-proliferative effect of quercetin found in this glioma lineage (Braganhol et al, 2006).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Brazilian agencies FAPERGS and CNPq.

REFERENCES

- [1] G. James, A.M. Butt, *Eur J Pharmacol* 447 (2002) 247-260.
- [2] Araque, V. Parpura, R.P. Sanzgiri, P.G. Haydon, *Trends Neurosci* 22 (1999) 208-215.
- [3] E.C. Holland, *Nature* 2 (2001) 120-129.
- [4] V. Ralevic, G. Burnstock, *Pharmacol Rev* 50 (1998) 413-492.
- [5] M.P. Rathbone, P.J. Middlemiss, J.W. Gysbers, A. Andrew, M. Herman, J.K. Reed, R. Ciccarelli, P. Di Iorio, F. Caciagli, *Prog Neurobiol* 59 (1999) 663-690.
- [6] H. Zimmermann, *Drug Development research* 52 (2001) 44-56.
- [7] R. Lemmens, L. Vanduffel, H. Teuchy, O. Culic, *J Biochem* 316 (1996) 551-557.
- [8] J.T. Neary, Y. Kang, Y. Bu, E. Yu, K. Akong, C.M. Peters. *J Neurosci*. 19 (1999), 4211-4220.
- [9] F.B. Morrone, A.P. Horn, J. Stella, F. Spiller, J.J.F. Sarkis, C. Salbego, G. Lenz, A.M.O. Battastini, *J Neurooncology*, 71 (2005) 135-140.
- [10] J. Spychalla, *Pharmacology Therapy* 87 (2000) 161-173.
- [11] H. Zimmermann, *Biochem. J.* 285 (1992) 345-354.
- [12] H.C. Ludwig, S. Rausch, K. Schallock, E. Markakis, *Anticancer Res* 19 (1999) 1747-1752.
- [13] L. Fastbom, A. Pazos, J.M. Palácios, *Neurosci.* 22(3) (1987) 813-826.
- [14] J. Turnay, N. Olmo, G. Reence, K. Von der Mark, M.A. Lizarbe. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25 (1989) 1055-1061.
- [15] J.M. Navaro, N. Olmo, J. Turnay, M.T. López-Conejo, M.A. Lizarbe. *Mol Cell Biochem.* 187 (1998) 121-131.

- [16] M. Vogel, H.J. Kowalewski, H. Zimmermann, A. Janetzko, R.U. Margolis, H.E. Wollny, *Biochem J.* 278 (1991) 199-202.
- [17] P. Ujházy, E.S. Berleth, J.M. Pietkiewicz, H. Kitano, J.R. Skaar, M.J. Ehrke, E. Mihich, *Int J Cancer.* 68 (1996) 493-500.
- [18] M. López- Lázaro, *Curr Med Chem.* 2 (2002) 691-714.
- [19] J.K. Dunnick, J.R. Hailey. *Fundam Appl Toxicol.* 19 (1992) 423-431.
- [20] G. Conseil, H. Baubichon-Cortay, G. Dayan, J.M. Jault, D. Barron, A. Di Pietro, *Proc natl Acad Sci USA* 95 (1998) 9831-9836.
- [21] M. Kavutcu, M.F. Melzig. *Pharmazie*, 54 (1999) 6, 457-459.
- [22] R.J. Willians, J.P.E. Spencer, C. Rice-Evans, *Free Radic Biol Med.* 36 (2004) 838-849.
- [23] M.R. Wink, G. Lenz, E. Braganhol, A.S.K. Tamajusuku, G. Schwartzmann, J.J.F. Sarkis, A.M.O. Battastini, *Cancer Letters.* 198 (2003) 211-218.
- [24] K. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, *Anal Biochem* 157 (1996) 375-380.
- [25] M.M. Bradford, *Anal Biochem* 72 (1976) 218-251.
- [26] E.M. Schwiebert, A. Zsembery, *Biochim.Biophys.Acta.* 1615 (2003) 7-32.
- [27] P.A. Insel, R.S. Ostrom, A.C. Zambon, R.J. Hughes, M.A. Balboa, D. Shehnaz, C. Gregorian, B. Torres, B.L. Firestein, M. Xing, S.R. Post, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 28 (2001) 4, 351-354.
- [28] M.R. Wink, E. Braganhol, A.S.K. Tamajusuku, E.A. Casali, J.Karl, M.L. Barreto-Chaves, J.J.F. Sarkis, A.M.O. Battastini, *Neurochemistry International* 43 (2003) 621-628.
- [29] S. Latini, F. Pedata, *J Neurochemistry.* 79 (2001) 463-484.

- [30] F.B. Morrone, M.C. Jacques-Silva, A.P. Horn, A. Bernardi, G. Schwartzmann, R. Rodnight, G. Lenz, *J Neuro-oncology* 64 (2003) 211-218.
- [31] B.B. Fredholm; M.P. Abbracchio; G. Burnstock, J.W. Daly, T.K. Harden, K.A. Jacobson, P. Leff, M. Willians, *Pharmacol Rev.* 46 (1994a) 143-156.
- [32] D.A. Wyatt, M.C. Edmunds, R. Rubio, R.M. Berne, R.D. Lasley, R.M. Mentzer, *Am J Physiol* 257 (1989) H1952-1957.
- [33] V. Lelievre, J.M. Muller, J. Falcon. *Eur J Pharmacol.* 341 (1998a) 289-297.
- [34] V Lelievre; JM Muller; J. Falcon, *Eur J Pharmacol.* 341 (1998b) 299-308.
- [35] VM Danylova, O.V. Andrukhova, V.S. Babiichuk, O. Andrukhov, E.B. Babiichuk, *Ukr Biokhim Zh.* 75 (2003) 71-76.
- [36] Y. Fujimura, K. Yamada, H. Tachibana, *Biochem Biophys Res Commun.* 336 (2005) 674-681.
- [37] H.C. Ludwig, S. Rauch, K. Schillock, E. Markakis, *Anticancer Res.* 19 (1999) 1747-1752.
- [38] T.B. Kang, N.C. Liang, *Biochem Pharmacol.* 54 (1997) 1013-1018.
- [39] F. Hugo, S. Mazurek, U. Zander, E. Eigenbrodt, *J Cell Physiol.* 153(1992) 539-549.
- [40] V. Stefanovic, P. Mandel, A. Rosenberg, *J Biol Chem.* 251 (1976) 3900-3905.

LEGENDS TO FIGURES

Fig 1 Nucleotide secretion by U138MG glioma cell. Glioma cells were incubated in reaction medium in absence of substrate for 90 min as described in materials and methods. The extracellular nucleotides/ nucleosides concentration (ATP, ADP, AMP, ADO adenosine, INO inosine) was measured by HPLC assay. The purine compounds were identified and measured by comparison with standards. Data represent the means of three independent experiments made in duplicate \pm SD.

Fig 2 Extracellular AMP metabolism on U138MG glioma cells. The glioma cultures were incubated with AMP as described in materials and methods. The presence of AMP, adenosine (ADO) and inosine (INO) were determined after separation in HPLC. The compounds of the purine cascade were identified and measured by comparison with standards. The data is a representative of three different experiments made in triplicate given similar AMP metabolism pattern.

Fig 3 Dose-response curve for inhibition of ecto-5'-NT/ CD73 by quercetin. The glioma cultures were exposed to increasing concentrations of quercetin (10 to 5×10^5 nM diluted in DMSO) and were incubated simultaneously with AMP as described in materials and methods. Specific activity values were expressed as nmol Pi/ min/ mg protein. Linear regression estimated the IC_{50} value = 45.3 μ M. Data represent the means of five independent experiments made in triplicate \pm SD.

Statistical differences were determined by one way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig 4 Rate of AMP hydrolysis by control (■) and quercetin exposed (□) U138MG glioma vs substrate concentration plot. Values are expressed as mean \pm SEM for three independent experiments made in triplicate. The kinetic parameters (V_{max} and K_m) were calculated from the presented substrate curves (inset) by Michaelis-Menten hyperbolic equation and summarized in the text.

Fig 5 Effect of quercetin treatment on the ecto-5'-NT/CD73 activity. After confluence, cells were treated with quercetin (10, 30 and 100 μ M) for 72 h and submitted to enzymatic assay as described in materials and methods. Specific activity values were expressed as nmol Pi/ min/ mg protein. Data represent the means of five independent experiments made in triplicate \pm SD. * indicates difference from control $p < 0.05$ as determined by one way ANOVA followed by Tukey's test.

Fig 6 Effect of quercetin treatment on ecto-5'-NT/CD73 expression in U138MG glioma analyzed by RT-PCR. Glioma cultures (control) and quercetin treated (30 and 100 μ M, for 72 h), were submitted to RNA extraction and processed for expression analysis of ecto-5'-NT/CD73. (A) The PCR products were separated on a 1% agarose gel. As a control for cDNA synthesis, GAPDH-PCR was performed. (B) Band intensity

quantification by Image J software. Representative data from two independent experiments given similar results.

Figure 1

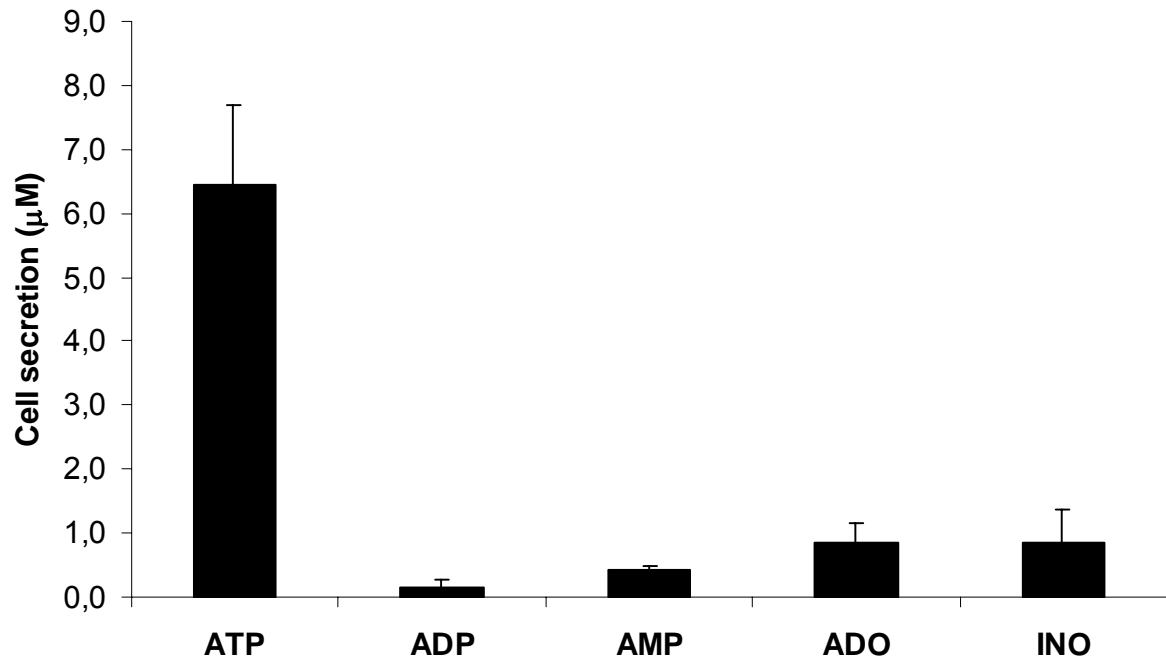


Figure 2

□

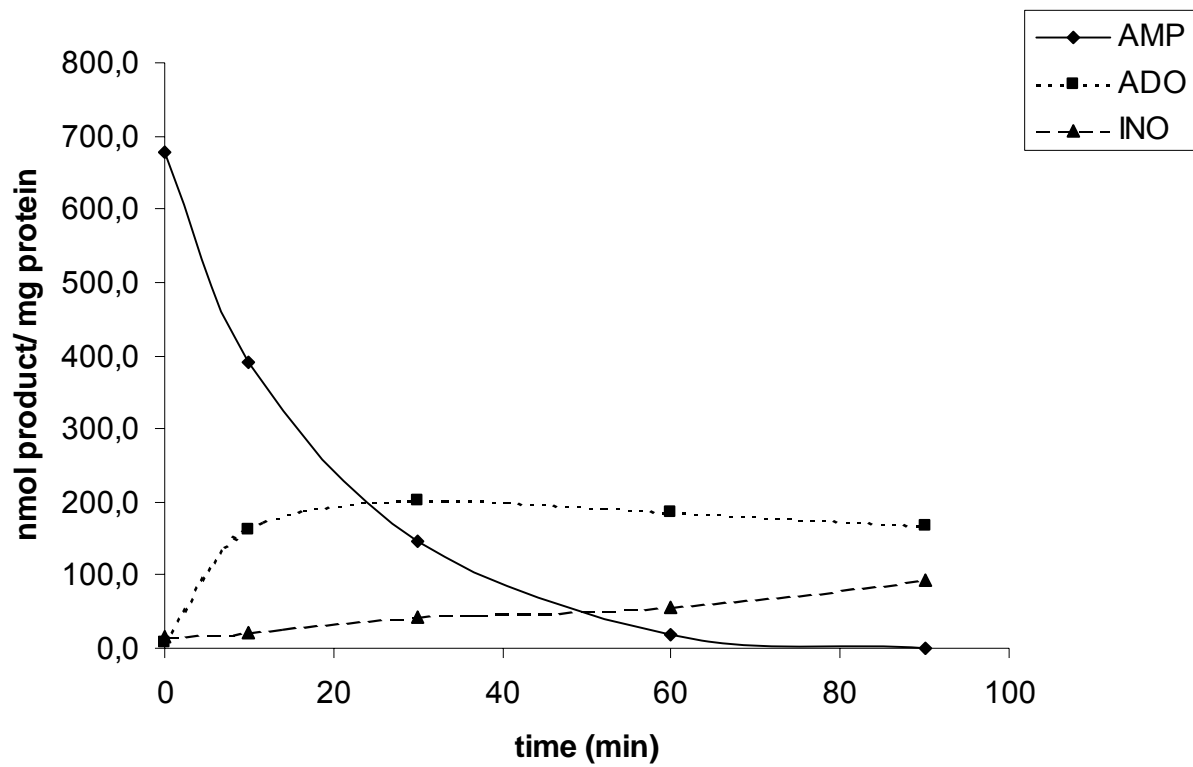


Figure 3

□

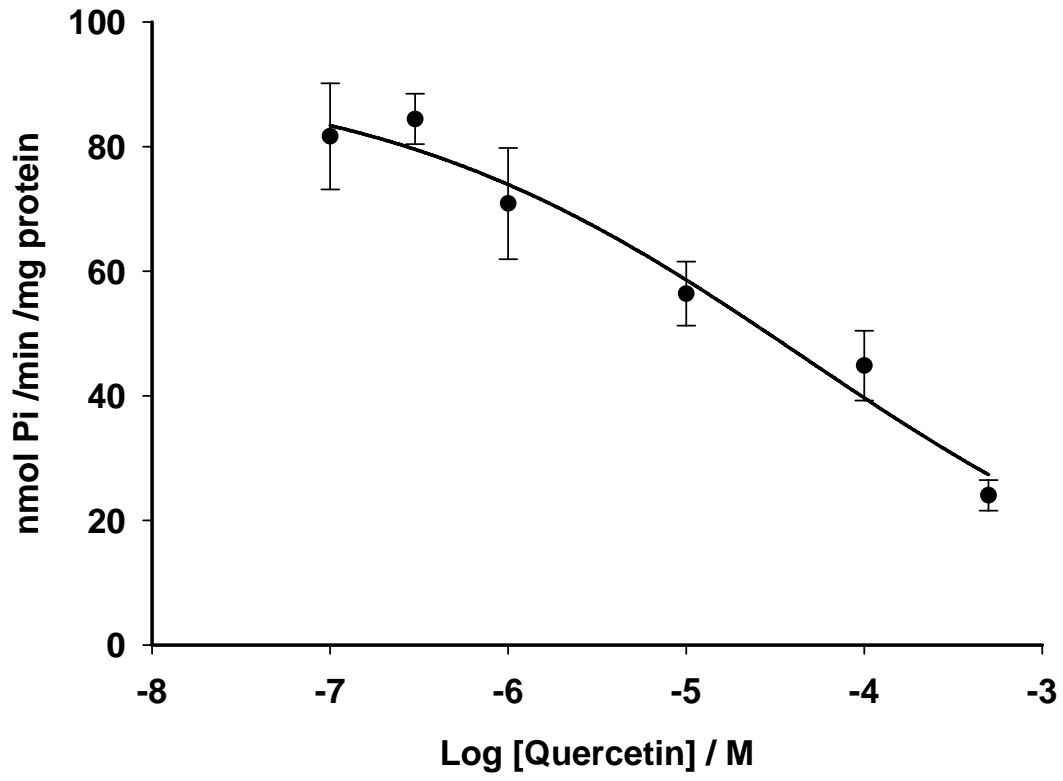
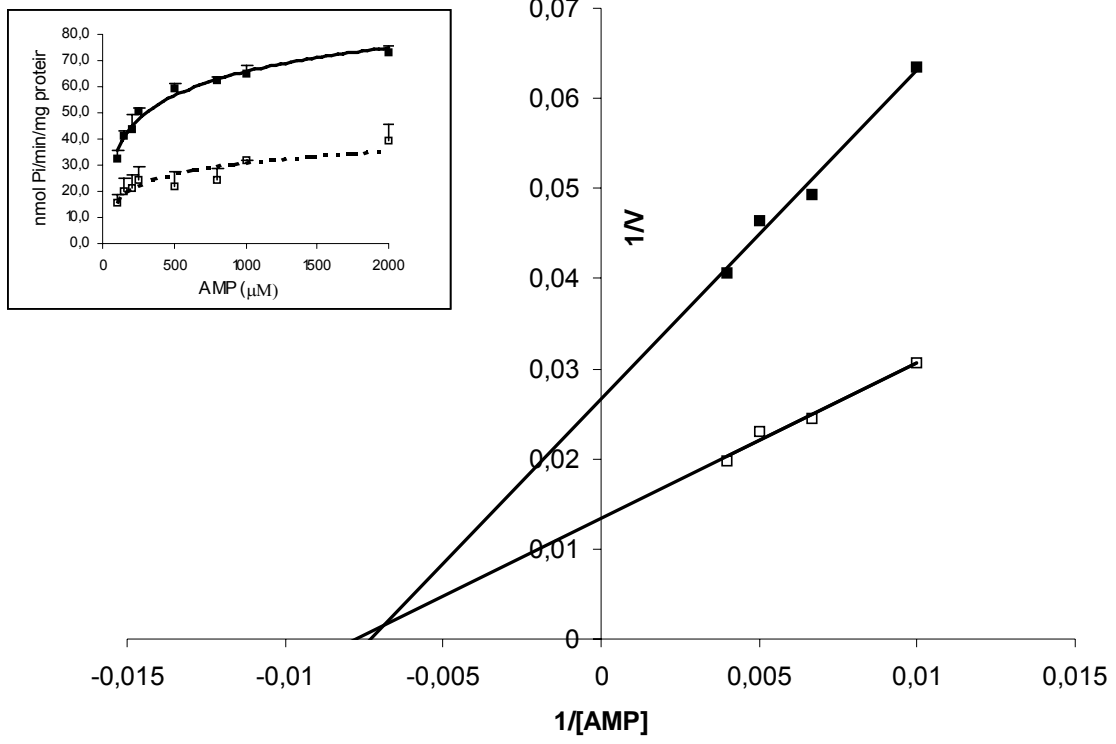


Figure 4



□

Figure 5

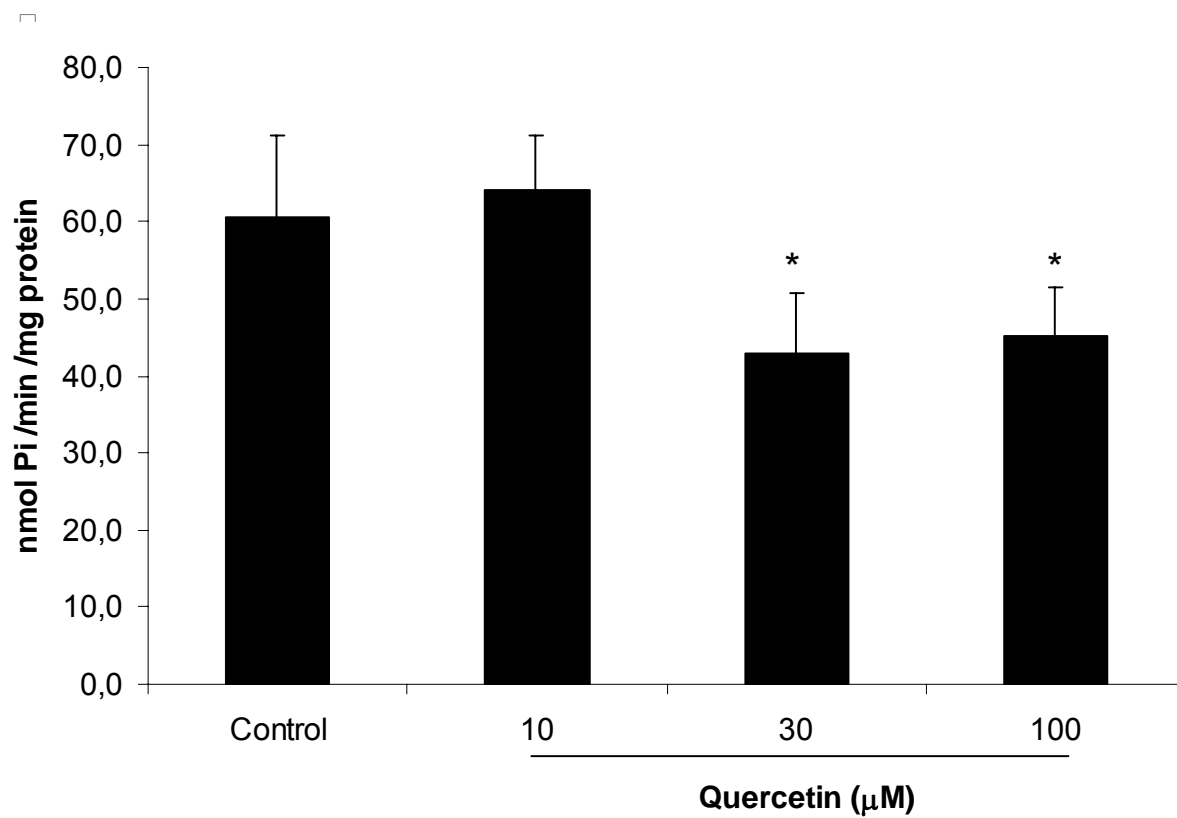
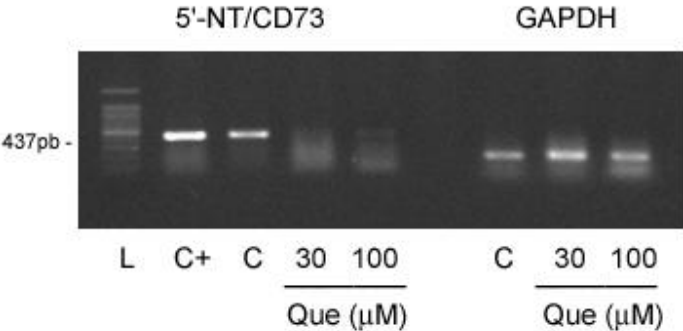
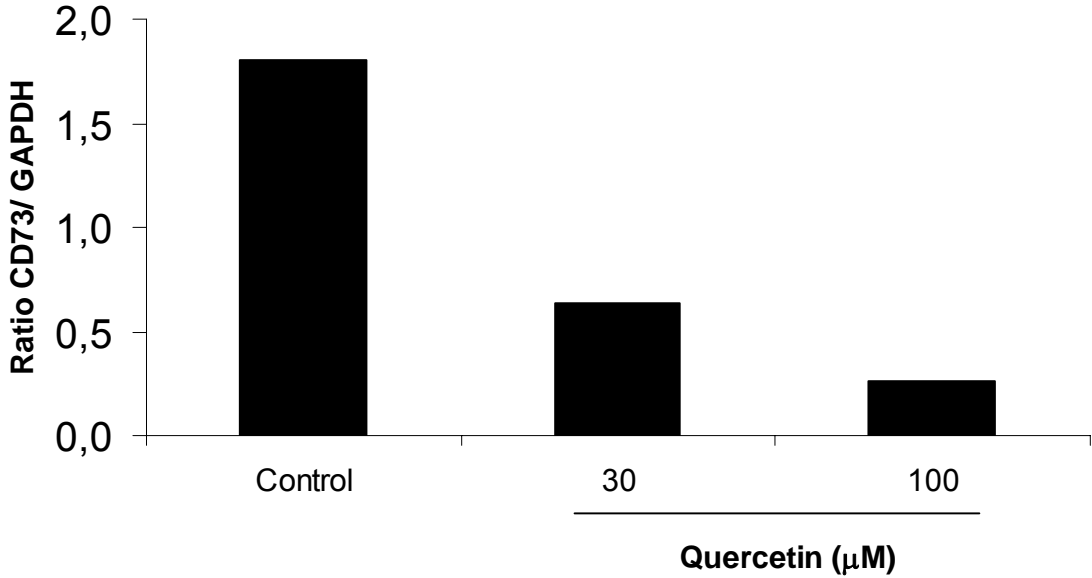


Figure 6

A



B



4. DISCUSSÃO

Gliomas representam o tipo mais comum e devastador de tumor primário do SNC. Apesar de intensos esforços em desenvolver novas terapias, agentes efetivos ainda não são disponíveis e a taxa de sobrevivência média permanece há muitos anos em torno de 9- 12 meses (Maher et al, 2001).

Recentes estudos mostram que um importante mecanismo usado por gliomas para invadir o tecido nervoso sadio é a excitotoxicidade através da liberação de glutamato. Nesse trabalho, Takano e colaboradores demonstram que gliomas secretores de glutamato apresentam uma vantagem proliferativa *in vivo* com relação aos não secretores (Takano et al, 2001). 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 realizados pelo nosso grupo demonstram fortes evidências de que a sinalização purinérgica está envolvida no crescimento e na progressão dos gliomas: i) gliomas apresentam baixas taxas de hidrólise de ATP e altas taxas de hidrólise de AMP quando comparados com astrócitos (Wink et al, 2003b), ii) ATP e adenosina extracelulares induzem estímulo proliferativo em diferentes linhagens de gliomas (Morrone et al, 2003); iii) ao contrário do tecido cerebral normal, gliomas apresentam uma clara resistência à morte induzida por concentrações citotóxicas de ATP (Morrone et al, 2005). Assim, o fato do ATP ser pouco metabolizado pelo glioma, enquanto que o AMP é rapidamente convertido a adenosina, poderia propiciar o acúmulo dessas moléculas sinalizadoras na superfície tumoral, resultando em estímulo proliferativo para as células cancerígenas e

citotoxicidade para o tecido normal. Tais achados tornam o sistema purinérgico um possível alvo de desenvolvimento de terapias anti-tumorais.

Nesse contexto, o flavonóide quercetina parece ser um candidato promissor para o tratamento tumoral. A quercetina possui um amplo espectro de ações farmacológicas, agindo nos sistemas biológicos como molécula antioxidante; interagindo com importantes vias de sinalização envolvidas em morte/ proliferação celular e, por fim, desencadeando ações inibitórias em uma variedade de enzimas (Williams et al, 2004) entre as quais a ecto-5'-NT/CD73 (Kavutcu e Melzig, 1999). A adenosina, produto da reação catalisada pela ecto-5'-NT/CD73, pode ser um fator positivo para o crescimento tumoral (Spychala, 2000). Assim, o fato dos gliomas apresentarem uma atividade de ecto-5'-NT/CD73 aumentada com relação às células normais, poderia estar relacionado com a habilidade do tumor em apresentar escape à resposta imune, importante característica envolvida na malignidade dos gliomas. Com isso, a nossa hipótese de trabalho inicial é que drogas com potencial para inibir a atividade da ecto-5'-NT/CD73, como a quercetina, poderiam ser eficientes em frear o crescimento dos gliomas.

Apesar de estudos prévios terem demonstrado o potencial antiproliferativo da quercetina em diferentes linhagens tumorais, ainda não havia estudos disponíveis sobre as ações da quercetina em linhagem de gliomas humanos (Williams et al, 2004). Então, o primeiro passo desse trabalho foi avaliar o possível efeito antiproliferativo da quercetina em linhagem de glioma humano U138MG. Os resultados demonstrados no Capítulo 1 dessa dissertação mostram que a quercetina foi eficiente em inibir a proliferação da linhagem de glioma U138MG. A inibição da proliferação envolveu os seguintes eventos: diminuição do número de células e da viabilidade celular; indução de morte celular por necrose e por

apoptose dependente de caspase; parada no ciclo celular na fase G2 e diminuição do índice mitótico.

A capacidade da quercetina em interagir com vias intracelulares está bem estabelecida (Williams et al, 2004). Um estudo recente demonstrou que a quercetina pode se associar eficientemente à membrana mitocondrial, diminuindo a sua fluidez, a produção de ATP e promovendo a liberação de Ca^{+2} , eventos críticos para a função celular, podendo resultar em morte celular tanto por necrose como por apoptose (Dorta et al, 2005). Além disso, a quercetina é uma inibidora da via da PI3K (Matter et al, 1992). Como consequência dessa inibição, segue-se a redução da fosforilação da AKT, liberação do citocromo *c*, formação do apoptossoma e subsequente ativação das caspases 3/7 (Datta et al, 1999). Tais eventos intracelulares podem justificar a indução de morte celular por necrose e a ativação das caspases 3/7 desencadeadas pela quercetina na linhagem estudada. A habilidade da quercetina em inibir a via da PI3K pode ser uma boa estratégia no tratamento dos gliomas, uma vez que devido a deleção da PTEN, essa via de sobrevivência celular encontra-se constitutivamente ativa e é um indicativo de mau prognóstico para os pacientes.

Alterações em genes envolvidos no controle do ciclo celular são características comuns aos gliomas humanos (Holland, 2001). Tais mudanças acarretam em desregulação do ciclo celular, com consequente divisão celular anômala e descontrolada. O gene p53 apresenta papel chave na decisão da célula entre parar no ciclo celular ou morrer via apoptose. Mutações no gene da p53 ocorrem em diversos tipos de tumor, incluindo o glioma U138MG (Ishii et al, 1999). A quercetina pode diminuir a expressão da p53 mutada, sem influenciar significativamente nos níveis de p53 normal (Ávila et al, 1996). A modulação da p53 pela quercetina pode justificar tanto a parada no ciclo celular, como a apoptose encontrada em nosso estudo. Entretanto, a possibilidade da quercetina estar

interagindo com proteínas reguladoras do ciclo celular, como ciclina D1 e CDK-4, não pode ser excluída.

Entre outras características envolvidas na agressividade do glioma está o elevado índice mitótico apresentado por esse tumor (Konopka e Boni, 2003). O potencial da quercetina em diminuir o índice mitótico das células do glioma demonstra que a parada no ciclo celular ocorre na entrada da fase G2, e não no segundo “check-point” da mitose, a anáfase. Essa ação denota a capacidade da quercetina em inibir a divisão celular, efeito farmacológico que pode ser útil na terapia anti-glioma.

Um dos resultados mais interessantes dessa dissertação foram os efeitos opostos que a quercetina desencadeou em culturas organotípicas hipocâmpais em relação aos efeitos encontrados nas culturas de glioma (Capítulo 1). Primeiramente, a exposição à quercetina *per se* não provocou dano celular às culturas organotípicas, enquanto que nas mesmas condições experimentais, esse flavonóide causou a morte celular dos gliomas em cultura. Adicionalmente, nossos resultados mostraram que o tratamento com quercetina preveniu as culturas organotípicas do dano isquêmico. É importante mencionar que a morte excitotóxica de células neuronais desempenha papel importante na etiologia dos gliomas (Takano et al, 2001). Assim, o fato da quercetina modular positivamente a sobrevivência neuronal e negativamente a sobrevivência dos gliomas, é um segundo fator que faz desse flavonóide um bom candidato para intervenções terapêuticas em gliomas. Estudos epidemiológicos têm sugerido que os flavonóides derivados da dieta apresentam um papel benéfico na prevenção de doenças neurodegenerativas, no declínio motor e cognitivo relacionado com a idade (Joseph et al, 1999; 1998) e em injúrias cerebrais (Inanami et al, 1998). Com relação a quercetina, estas ações parecem ser mediadas via supressão da cascata da JNK e da inibição da apoptose provocada por peróxido de hidrogênio (Wang et

al, 2002). Por outro lado, algumas investigações indicam que a quercetina pode induzir morte neuronal via um mecanismo envolvendo a inibição das cascatas de sinalização da Akt/PKB e da ERK, importantes vias de sobrevivência celular (Spencer et al, 2003b). Uma possível explanação para os efeitos controversos desencadeados pela quercetina é que essa molécula apresenta características tanto pro - como antioxidantes e o efeito resultante está relacionado com o estado redox da célula e com as vias de sinalização envolvidas (Lee et al, 2003). Outro ponto que deve ser ressaltado é que em cultura organotípica, células neuronais e gliais co-existem e suas conexões sinápticas permanecem íntegras, características que fazem desse tipo de cultura uma boa ferramenta de estudo, já que se aproxima da situação encontrada *in vivo*. Estudos demonstram que os astrócitos acumulam elevados níveis de flavonóides, incluindo a quercetina, e são capazes de metabolizá-los via rotas não oxidativas (Spencer et al, 2004). Assim, o acúmulo e o metabolismo astrocítico dos flavonóides podem estar acontecendo antes dos neurônios serem expostos a essas substâncias, o que supostamente pode resultar em neuroproteção e não em dano neuronal, como reportado por outros trabalhos (Williams et al, 2004).

Realizada a caracterização do efeito antiproliferativo da quercetina em linhagem de glioma U138MG, nós partimos para o estudo das ações da quercetina sobre o sistema purinérgico, mais especificamente sobre a ecto-5'-NT/CD73, enzima geradora de adenosina no meio extracelular (Zimmermann, 1992) (Capítulo 2). Em um estudo prévio, nós demonstramos que os gliomas apresentam uma elevada atividade AMPásica (Wink et al, 2003b), porém o metabolismo e o destino dos produtos de degradação do AMP não foram avaliados naquele trabalho. Assim, por análise via HPLC, nós determinamos o metabolismo do AMP e o padrão de secreção de nucleotídeos/ nucleosídeos apresentados por essa linhagem tumoral.

Nucleotídeos e nucleosídeos derivados da adenina podem ser liberados por diversos tipos celulares em condições patofisiológicas, modulando uma variedade de efeitos (Schwiebert e Zsembery et al, 2003). As culturas de glioma secretaram quantidades detectáveis de ATP, ADP, AMP, adenosina e inosina. A concentração de ATP no meio extracelular foi maior do que a das outras moléculas analisadas, provavelmente reflexo da baixa atividade ATPásica apresentada por essas células e potencialmente pode resultar em ativação dos receptores P2. A concentração de adenosina detectada no espaço extracelular é suficiente para a ativação dos receptores P1 (A_1 e A_{2a}) (Fredholm et al, 2001). Adenosina pode estar sendo liberada através de transportadores de nucleosídeos equilibrativos ou pode estar sendo gerada extracelularmente, a partir da hidrólise do AMP secretado. A liberação desses nucleotídeos/nucleosídeos para o meio extracelular pode estimular os receptores purinérgicos de uma forma parácrina e autócrina, podendo ativar cascatas de sinalização responsáveis por uma variedade de ações relacionadas à proliferação, invasão e morte do tecido normal adjacente ao tumor (Insel et al, 2001).

A análise do metabolismo do AMP demonstrou que as culturas de gliomas foram eficientes em hidrolisá-lo, em acordo com a elevada atividade AMPásica apresentada por essas células. Ao final da reação, o produto mais abundante no meio extracelular foi adenosina. Isso caracteriza mais uma diferença com relação aos astrócitos, uma vez que tais células rapidamente removem a adenosina do espaço extracelular, gerando inosina pela ação da adenosina deaminase (ecto-ADA) (Wink et al, 2003a). Em determinadas condições patofisiológicas, como no câncer, parece haver uma regulação coordenada das enzimas que metabolizam a adenosina (ecto- ADA e ecto-5'-NT/CD73), resultando em um aumento na expressão da ecto-5'-NT/CD73 e uma concomitante diminuição na expressão da ecto-ADA. Tal mudança poderia favorecer o aumento dos níveis extracelulares de adenosina,

desencadeando ações que incluem efeitos promotores tumorais e imunossupressores (Spychala, 2000). Assim, os perfis de secreção de derivados de adenina e do metabolismo do AMP apresentados pela linhagem U138MG corroboram com a hipótese de que alterações na sinalização purinérgica podem ser uma característica desse tipo de tumor e que podem estar envolvidos na elevada malignidade dos gliomas.

Um estudo prévio avaliou os efeitos de diferentes flavonóides sobre uma ecto-5'-NT/CD73 comercial e demonstrou que a quercetina foi a mais potente molécula inibidora dessa enzima testada (Kavutcu e Melzig, 1999). Então, nós decidimos investigar se a quercetina exibiria o mesmo efeito inibitório sobre a ecto-5'-NT/CD73 presente na linhagem U138MG. De fato, em nossos experimentos *in vitro*, a exposição das culturas de glioma à quercetina por apenas 10 min (durante a incubação com o substrato, AMP), foi suficiente para causar uma inibição da atividade enzimática de 30 – 70% para as diferentes concentrações do flavonóide testadas e um valor de IC₅₀ = 45,3 µM foi encontrado. O estudo cinético utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk caracterizou a inibição como não-competitiva. Esse perfil de inibição pode ser resultado da interação da quercetina com os domínios de membrana insolúveis a detergente (rafts) (Fujimura et al, 2005), os quais são enriquecidos em ecto-5'-NT/CD73 (Danylova et al, 2003). A associação “quercetina-raft” poderia estar gerando uma instabilidade estrutural da enzima, resultando no padrão de inibição encontrado. Entretanto, mais estudos são necessários para validar essa hipótese.

A quercetina, devido a suas características lipofílicas, é hábil em atravessar as membranas celulares e em interagir com vias de sinalização intracelulares e com fatores de transcrição (Williams et al, 2004). Então, com o objetivo de melhor estudar o efeito inibitório da quercetina sobre a ecto-5'-NT/CD73, nós avaliamos se a exposição prolongada da linhagem de glioma à quercetina resultaria em trocas na atividade e/ou expressão dessa

enzima. O tratamento das células com quercetina (30 e 100 μM) por 72 h resultou em inibição da hidrólise do AMP. Em acordo com os dados de atividade enzimática, a análise dos níveis de mRNA da ecto-5'-NT/CD73 revelou que a quercetina inibiu a expressão dessa enzima, demonstrando que esse flavonóide além de interagir diretamente com a estrutura da enzima, conforme atestado pelos experimentos *in vitro*, também pode modular a atividade da ecto-5'-NT/CD73 em nível de expressão gênica. Embora sejam necessários mais experimentos para esclarecer a via sinalizatória envolvida nesse efeito, algumas especulações podem ser feitas. A quercetina apresenta atividade inibitória sobre várias proteínas kinases, incluindo a PKC (Ferriola et al, 1989). Então, uma vez que a via da PKC modula positivamente a expressão da ecto-5'-NT/CD73 (Ludwig et al, 1999), a diminuição da expressão dessa enzima pode ser correlacionada com a inibição da via da PKC pela quercetina.

Como já discutido anteriormente, a quercetina pode modular uma série de vias intracelulares que, ao final, resultam em efeitos antiproliferativos em linhagens tumorais. Com base nos nossos resultados que demonstram que a quercetina é eficiente em modular a atividade e a expressão da ecto-5'-NT/CD73 do glioma U138MG, nós propomos que as ações antiproliferativas exibidas pela quercetina nessa linhagem (Capítulo 1) também podem ser resultado da interação dessa molécula com o sistema purinérgico (Capítulo 2). A ecto-5'-NT/CD73 é expressa ou a sua expressão é aumentada em células que estão em processo de maturação, migração ou crescimento. Este fato já foi documentado para diversos tipos de tecidos e de sistemas celulares (Turnay et al, 1989) bem como para numerosos tipos de tumor, incluindo o glioma U138MG (Durak et al, 1994; Canbolat et al, 1996; Wink et al, 2003b). Além disso, ecto-5'-NT/CD73 interage com proteínas de citoesqueleto, como a laminina e a fibronectina, o que é um indicativo de que essa proteína

está envolvida em processos de interação célula-célula e célula-matriz (Dieckhoff et al, 1986b). Elevada atividade de ecto-5'-NT/CD73 também está associada com resistência a drogas antitumorais, onde a elevada atividade enzimática está relacionada com a síntese *de novo* do ATP, molécula energética necessária para o bombeamento da droga para o meio extracelular (Ujházy et al, 1996). Com respeito a função catalítica apresentada por essa proteína, o produto da reação catalisada pela ecto-5'-NT/CD73, adenosina, é um dos fatores que potencialmente pode contribuir para o crescimento do tumor. Estudos demonstram que adenosina acumula em elevadas concentrações em tumores sólidos, podendo estimular crescimento tumoral, angiogênese e inibição da síntese de citocinas e da adesão de células do sistema imune (Spychala, 2000). Por outro lado, o AMP, molécula precursora da adenosina, demonstrou exercer efeito antiproliferativo em linhagem de tumor de mama (MCF-7), estando essa ação vinculada à inibição da glicólise (Hugo et al, 1992). Recentemente, foi caracterizado um receptor purinérgico para a ligação do AMP, denominado P2Y15, o qual pode ser o responsável pelas ações, até agora pouco conhecidas, do AMP extracelular (Inbe et al, 2004). Dessa forma, nós propomos que a ação inibitória da quercetina sobre a ecto-5'-NT/CD73 em cultura de glioma pode resultar em efeito antiproliferativo devido a: i) diminuição da disponibilidade da adenosina no meio extracelular; ii) provável acúmulo de AMP, um inibidor da proliferação e iii) inibição da migração e adesão celular, importantes mecanismos de invasão tumoral.

A terapia farmacológica dos gliomas é limitada pela BHE e, na maior parte dos casos, a estratégia de tratamento fica limitada à ressecção cirúrgica do tumor e a radioterapia (De Angelis, 2001). Considerando que a quercetina atravessa a BHE (Youdim et al, 2003), que os resultados obtidos nessa dissertação apontam que esse flavonóide exerce efeito antiproliferativo em culturas de glioma e que não apresenta citotoxicidade

para o tecido normal, uma das maiores desvantagens da quimioterapia convencional, nós acreditamos que essa molécula pode ser um candidato promissor para o tratamento dos gliomas. Apesar de algumas investigações apontarem que após ingestão oral os níveis plasmáticos de quercetina alcançam concentrações na faixa do baixo micromolar (Manach e Donovan, 2004; Boer et al, 2005), como alternativa a essa limitação, nós sugerimos o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, como polímeros carreadores, capazes de aumentar a biodisponibilidade e a concentração dessa molécula em tecidos alvo.

Em conclusão, nossos resultados podem abrir novas perspectivas para o estudo das potenciais aplicações dos flavonóides no tratamento e prevenção de tumores cerebrais. Investigações adicionais usando modelo de glioma *in vivo* podem ser úteis para confirmar os efeitos antiproliferativos da quercetina, bem como para determinar os níveis apropriados desse flavonóide para a otimização dos seus efeitos *in vivo*.

5. CONCLUSÕES

GERAIS

- 1) Quercetina exibiu efeitos opostos em células tumorais *versus* células normais: ação antiproliferativa em culturas de glioma humano U138MG e ação neuroprotetora em culturas organotípicas hipocampais de rato.
- 2) Quercetina foi hábil em interagir com o sistema purinérgico, através de inibição da atividade e da expressão da ecto-5'-NT/CD73, enzima super-expressa em gliomas.
- 3) A inibição da enzima ecto-5'-NT/CD73 em gliomas também pode ser uma via envolvida na ação antiproliferativa da quercetina nessa linhagem de tumor.

ESPECÍFICAS

- 1) Quercetina exibiu ação antiproliferativa em culturas de linhagem de glioma U138MG. A inibição da proliferação envolveu os seguintes eventos: diminuição do número de células e da viabilidade celular; indução de morte celular por necrose e por apoptose dependente de caspase; parada no ciclo celular na fase G2 e diminuição do índice mitótico.
- 2) Enquanto a quercetina foi citotóxica para o glioma, ela foi hábil em proteger as culturas organotípicas do insulto isquêmico, caracterizando um provável efeito seletivo de toxicidade tumoral.
- 3) Culturas de glioma U138MG apresentaram secreção dos seguintes derivados da adenina: ATP, ADP, AMP, adenosina e inosina.

- 4) O metabolismo do AMP e o destino dos seus produtos de degradação foram avaliados. As culturas de gliomas foram eficientes em metabolizar o AMP extracelular, com conseqüente acúmulo de adenosina, mais uma diferença com relação às culturas de astrócitos.
- 5) Em experimentos *in vitro*, a quercetina inibiu a atividade da ecto-5'-NT/CD73 em cultura de gliomas de forma não-competitiva.
- 6) Em experimentos de longa exposição das cultura de gliomas à quercetina, esse flavonóide (100 μ M e 72 h de tratamento) inibiu a atividade e a expressão da ecto-5'-NT/CD73.

6. PERSPECTIVAS

- 1) Analisar a ação da quercetina sobre as enzimas que hidrolisam ATP e ADP extracelulares (E-NTPDases) em cultura de glioma.
- 2) Analisar o efeito da quercetina sobre a formação de microtúbulos em culturas de glioma humano U138MG.
- 3) Avaliar o efeito antiproliferativo da quercetina sobre outras linhagens de tumores.
- 4) Analisar o efeito antiproliferativo da quercetina em modelo de implante *in vivo* de glioma em cérebro de ratos, utilizando como forma de tratamento quercetina em nanopartículas.
- 5) Em modelo de implante *in vivo* de glioma em cérebro de ratos, avaliar perfil farmacocinético do tratamento com quercetina em nanopartículas, bem como o impacto dessa exposição sobre tecidos periféricos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO M. P., SAFFREY M. J., PÓQUER V., BURNSTOCK G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience* **59**, 67-76, 1994.
- ADINOLFI E., PIZZIRANI C., IDZKO M., PANTHER E., NORGAEUER J., DI VIRGILIO F., FERRARI D. P2X7 receptor: Death or life? *Purinergic Signalling*. **1**, 219-27, 2005.
- AVILA M.A., CANSADO J., HARTER K.W., VELASCO J.A., NOTÁRIO V. Quercetin as a modulator of the cellular neoplastic phenotype. *Adv Exp Med Biol* **401**, 101-10, 1996.
- BALLERINI, P., CICCARELLI, R., DI IORIO, P., GIULIANI, P. AND CACIAGLI, F. Influence of Ca²⁺ channel modulators on [3H]purine release from rat cultured glial cells. *Neurochem. Res.* **20**, 627-34, 1995.
- BEECHER G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake *J. Nutr.* **133**, 3248S–54S, 2003.
- BENNET G.C., BOARDER M.R. The effect of nucleotides and adenosine on stimulus evoked glutamate from rat brain cortical slice. *Br J Pharmacol.* **131**, 617-23, 2000.
- BODIN P., BURNSTOCK G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem. Res.* **26**, 959-69, 2001.
- BOER V.C.J., DIHAL A.A., VAN DER WOUDE H., ARTS I.C.W., WOLFFRAM S., ALINK G.M., RIETJENS M.C.M., KEIJER J., HOLLMAN P.C.H. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J. Nutr.* **135**, 1718-25, 2005.
- BRANDES A.A., PASETTO L.M., VASTOLA F., MONFARDINI S. Temozolomide in patients with high grade gliomas. *Oncology* **59**(3), 181-86, 2000.

- BURNSTOCK G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem.* **4**, 793-803, 2004.
- BURNSTOCK G. Purinergic receptors. *J. Theor. Biol.* **62**, 491-503, 1976.
- BURNSTOCK G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones, pp. 107-118. Eds L. Bolis and R. W. Straub. Raven, New York 1978.
- CACIAGLI F., CICCARELLI R., DI IORIO P., TACCONELLI L. AND BALLERINI P. Influence of PLA-PG system on purine release and cAMP content in dissociated primary glial cultures from rat striatum. *Pharmac. Res.* **21**, 271-84, 1989.
- CANBOLAT O., DURAK I., CETIN R., KAVUTCU M., DEMIRCI S., OZTURK S. Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. *Breast Cancer Res Treat.* **37**, 189-93, 1996.
- CHEKENYA M., PILKINGTON G.J. NG2 precursor cells in neoplasia: functional, histogenesis and therapeutic implications for malignant brain tumours. *J Neurocytol.* **31**(6-7), 507-21, 2002.
- CHINTALA S.K., TONN J.C., RAO J.S. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Dev Neuroscience* **17**, 495-502, 1999.
- CONSEIL G., BAUBICHON-CORTAY H., DAYAN G., JAULT J. M., BARRON D., DI PIETRO A. Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9831-36, 1998.
- CSOKAY B., PRAJDA N., WEBER G., OLAH E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci* **60**, 2157-63, 1997.
- DAI C., HOLLAND E. C. Glioma models. *Biochem. Biophys. Acta* **1551**, M19-M27, 2001.

- DANYLOVA V.M., ANDRUKHOVA O.V., BABIICHUK V.S., ANDRUKHOV O.I., BABIICHUK E.B. Catalytic characteristics of 5'-nucleotidase in the structure of cell membrane rafts in smooth muscles. *Ukr Biokhim Zh* **75**(3), 71-6, 2003.
- DATTA S.R., BRUNET A., GREENBERG M.E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **13**: 2905-27, 1999.
- DE ANGELIS L.M. Brain tumors. *N Engl J Med* **344**(2), 114-23, 2001.
- DIECKHOFF J., MOLLENHAUER J., KUHL U., NIGGEMEYER B., VON DER MARK K., MANNHERZ H.G. The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin modify the AMPase activity of 5'-nucleotidase from chicken gizzard smooth muscle. *FEBS Lett.* **195** (1-2), 82-6, 1986.
- DOETSCH F., PETREANU L., CAILLE I., GARCIA-VERDUGO J.M., ALVAREZ-BUYLLA A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron.* **36** (6), 1021-34. 2002.
- DORTA D., PIGOSO A.A., MINGATTO F.E., RODRIGUES T., PRADO I.M.R., HELENA A.F.C. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chem Biol Interact* **152**, 67-78, 2005.
- DUARTE F., PITTELLA J. E. H., ÁVILA C. M. In: Filho GB. *et al.* Bogliolo Patologia. 5 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.723-825, 1994.
- DURAK I., ISIK A.C. CANBOLAT O., AKYOL O., KAVUTCU M. Adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues. *Free Radic Biol Med.* **16**, 825-31, 1994.

- FASTBOM L., PAZOS A., PALACIOS J.M. The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neurosci.* **22**(3), 813-26, 1987.
- FERRIOLA P.C., CODY V., MIDDLETON E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids: kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* **38**, 1617-24, 1989.
- FREDHOLM B.B., IJZERMAN A.P., JACOBSON K.A., KLOTZ K.N., LINDEN J. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**(4), 527-52, 2001.
- FUJIMURA Y., YAMADA K., TACHIBANA H. A lipid raft-associated 67kDa laminin receptor mediates suppressive effect of epigallocatechin-3-O-gallate on FcepsilonRI expression. *Biochem Biophys Res Commun.* **21**, 674-81, 2005.
- GALATI G., TENG S., MORIDANI M.Y., CHAN T.S., O BRIEN P.J. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol. Drug Interact.* **17**, 311-49, 2000.
- GIROLAMI V. *et al.* O Sistema Nervoso Central. in: Cotran RS, Kumar V, Collins. Robbins Patologia estrutural e funcional. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- GOYAL L. Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell* **104**, 805-8, 2001.
- GREEN D. R., REED J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-12, 1998.
- GROBBEN B., DE DEYN P. P., SLEGGERS H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion, *Cell Tissue Res.* **310**, 257-70, 2002.
- HAMMARBERG C., SCHULTE G., FREDHOLM B.B. Evidence for functional adenosine A3 receptors in microglia cells. *J Neurochem.* **86** (4), 1051-54, 2003.

- HARDEN, T. K., BOYER, J. L. AND NICHOLAS, R. A. P2-Purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *A. Rev. Pharmac. Toxic.* **35**, 541-79, 1995.
- HAVSTEEN B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* **96**(2-3):67-202, 2002.
- HERTOG M.G.L., HOLLMAN P.C.H, KATAN M.B., KROMHOUT D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer* **20**, 21-9, 1993.
- HOLLAND E. C. Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models. *Nature* **2**, 120-29, 2001.
- HOLLMAN P.C., KATAN M.B. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res.* **31**, S75-80, 1999.
- HUGO F., MAZUREK S., ZANDER U., EIGENBRODT E. In vitro effect of extracellular AMP on MCF-7 breast cancer cells: inhibition of glycolysis and cell proliferation. *J Cell Physiol.* **153**(3), 539-49, 1992.
- IDELSON G.H. Molecular diversity of P2 receptors. *Modulator.* **14**, 11-13, 2001.
- INAL M.E., KAHRAMAN A. Protective effects of quercetin on ultraviolet A light-induced oxidative stress in the blood of rat. *J Appl Toxicol.* **22** (5), 303-9, 2002.
- INANAMI O., WATANABE Y., SYUTO B., NAKANO M., TSUJI M., KUWABARA M. Oral administration of (-)catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil. *Free Radic. Res.* **29**, 359-65, 1998.
- INBE H., WATANABE S., MIYAWAKI M., TANABE E., ENCINAS J.A. Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y15, for AMP and adenosine. *JBC*, **279** (19), 19790-9, 2004.

- INSEL P.A., OSTROM R.S., ZAMBON A.C., HUGHES R.J., BALBOA M.A., SHEHNAZ D., GREGORIAN C., TORRES B., FIRESTEIN B.L., XING M., POST S.R. P2Y receptors of MDCK cells: epithelial cell regulation by extracellular nucleotides. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **28**(4), 351-4, 2001.
- ISHII N., MAIER D., MERLO A., TADA M., SAWAMURA Y., DISERENS A.C. Frequent co-alterations of TP53, p16/ CDKN2A, p14 ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* **9**, 469-79, 1999.
- JAMES S. AND RICHARDSON P. J. Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J. Neurochem.* **60**, 219-27, 1993.
- 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.
- JOSEPH J.A., SHUKITT-HALE B., DENISOVA N.A., BIELINSKI D., MARTIN A., MCEWEN J.J., BICKFORD P.C. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci.* **19**, 8114-21, 1999.
- JOSEPH J.A., SHUKITT-HALE B., DENISOVA N.A., PRIOR R.L., CAO G., MARTIN A., TAGLIALATELA G., BICKFORD P.C. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci.* **18**, 8047-55, 1998.
- KAVUTCU M., MELZIG M.F. In vitro effects of selected flavonoids on the 5'-nucleotidase activity. *Pharmazie* **54** (6), 457-9, 1999.

- KONG A. N., YU R., CHEN C., MANDLEKAR S., PRIMIANO T. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch. Pharm. Res.* **23**,1 –16, 2000.
- KONOPKA G., BONNI A. Signaling pathways regulating gliomagenesis. *Curr Mol Med.* **3**, 73-84, 2003.
- LATINI S., PEDATA F. Adenosine in the cerebral nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* **79**, 463-84, 2001.
- LAWS JR E. R., SHAFFREY M. E. The inherent invasiveness of cerebral Gliomas: implications for clinical management. *Int. J. Neurosci.* **17**, 413-20, 1999.
- LEE J.C., KIM J., PARK J.K., CHUNG G.H., JANG Y.S. The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cell: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* **291**, 386-97, 2003.
- LIN H., BONDY M.L., LANGFORD L.A., HESS K.R., DELCLOS G.L., WU X., CHAN W., PERSHOUSE M.A., YUNG W.K., STECK P.A. Allelic deletion analyses of MMAC/PTEN and DMBT1 loci in gliomas: relationship to prognostic significance.. *Clin Cancer Res.* **4**, 2447-54, 1998.
- LÓPEZ- LÁZARO M. Flavonoids as anticancer agents: structure- activity relationship study. *Curr Med Chem* **2**, 691-714, 2002.
- LUDWIG H.C., RAUCH S., SCHLLOCK K., MARKAKIS E. Expression of CD 73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. *Anticancer Res* **19**(3A), 1747-52, 1999.
- MA Z., HUNG T., HOA HUYNH T., TIEN DO P., HUYNH H. Reduction of rat prostate weight by combined quercetin- finasteride treatment is associated with cell cycle deregulation. *J Endocrinol* **181**, 493-507, 2004.

- MAHER E. A., FURNARI F. B., BACHOO R. M., ROWITCH D. H., LOUS D. N., CAVENEE W. K., DEPINHO R. A. Malignant glioma, genetics and biology of a grave matter, *Genes Dev.* **15**, 1311-33, 2001.
- MANACH C., DONOVAN J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic. Res.* **38**, 771-85, 2004.
- MATTER W. F., BROWN R. F., VLAHOS C. J. The inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by quercetin and analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 624-31, 1992.
- MORRONE FB, JACQUES-SILVA MARIA C., HORN AP, BERNARDI A., SCHWARTSMANN G, RODNIGHT R, LENZ, G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell line. *J Neuro-oncology* **64**, 211-18, 2003.
- MORRONE FB, HORN AP, STELLA J, SPILLER F, SARKIS JJF, SALBEGO C., LENZ G, BATTASTINI AMO. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neuro-oncology* **71**, 135-140, 2005.
- NEARY, J. T., RATHBONE, M. P., CATTABENI, F., ABBRACCHIO, M. P. AND BURNSTOCK, G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* **19**, 13-18, 1996.
- NEARY J.T., MCCARTHY M., KANG Y., ZUNIGA S. Mitogenic signaling from P1 and P2 purinergic receptors to mitogen-activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures. *Neurosci Lett.* **242** (3), 159-162, 1998.
- PALMER T. M. AND STILES G. L. Neurotransmitter receptors, VII. Adenosine receptors. *Neuropharmacol* **34**, 683-94, 1995.
- PALMER T.D., WILLHOITE A.R., GAGE F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* **425**, 479-94, 2000.

- PLESNER L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* **158**, 141-214, 1995.
- RATHBONE M. P., MIDDLEMISS P. J., GYSBERS J. W., ANDREW C., HERMAN M. A. R., CICCARELLI R., DI IORIO P., CACIAGLI F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* **59**, 663–90, 1999.
- REYA T., MORRISON S.J., CLARKE M.F., WEISSMAN I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* **414**(6859), 105-11, 2001.
- RICE-EVANS C. A., MILLER N. J., PAGANGA G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933–56, 1996.
- RICE-EVANS C. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **8**, 797–807, 2001.
- ROSS J. A., AND KASUM C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 19–34, 2002.
- SANAI N., ALAVREZ-BUYLLA A., BERGER M.S. Neuronal stem cells and the origin of gliomas, *N Engl J Med.* **353**, 811-22, 2005.
- SCHOEN S.W., GRAEBER M.B., TÓTH L., KREUTZBERG G.W. nucleotidase in postnatal ontogeny of rat cerebellum: a marker for migrating nerve cells? *Dev Brain Res.* **39**, 125-36, 1988.
- SCHROETER H., BOYD C., SPENCER J.P.E., WILLIAMS R.J., CADENAS E., RICE-EVANS C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging* **23**, 861–80, 2002.
- SCHWIEBERT E. M. AND ZSEMBERY A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1615** (1-2), 7-32, 2003.
- SHOSHAN Y., NISHIYAMA A., CHANG A., MORK S., BARNETT G.H., COWELL J.K., TRAPP B.D., STAUGAITIS S.M. Expression of oligodendrocyte progenitor cell

- antigens by gliomas: implications for the histogenesis of brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96** (18), 10361-6, 1999.
- SPENCER J. P. E., SCHROETER H., CROSSTHWAITHE A. J., KUHNLE G., WILLIAMS R. J., RICE-EVANS C. Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1139–46, 2001.
- SPENCER J. P. E., KUHNLE G. G., WILLIAMS R. J., RICE-EVANS C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem. J.* **372**, 173–81, 2003a.
- SPENCER J.P.E., RICE-EVANS C., WILLIAMS R.J. Modulation of pro-survival Akt/ Protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *JBC.* **278** (37), 34783-93, 2003b.
- SPENCER J.P., ABD-EL-MOHSEN M.M., RICE-EVANS C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys.* **423** (1), 148-61, 2004.
- SPYCHALA J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* **87**, 161-73, 2000.
- STEINBERG F.M., BEARDEN M.M., KEEN C.L. Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *J. Am. Diet. Assoc.* **103**, 215–23, 2003.
- SURH Y.J., PARK K.K., CHUN K.S., LEE L.J., LEE E., LEE S.S. Anti-tumor-promoting activities of selected pungent phenolic substances present in ginger. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* **18**(2):131-9, 1999.

- SURH Y. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* **3**, 768-80, 2003.
- TAKANO T., LIN J. C., ARCUINO G., GAO Q., YANG J., NEDERGAARD M. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med.* **7**, 1010-15, 2001.
- TURNAY J., OLMO N., REENCE G., VON DER MARK K., LIZARBE M.A. 5'-Nucleotidase activity in cultured cell lines: effect of different assay conditions and correlation with cell proliferation. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **25**, 1055-61, 1989.
- UJHÁZY P., BERLETH E.S., PIETKIEWICZ J.M., KITANO H., SKAAR J.R., EHRKE M.J., MIHICH E. Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance. *Int J Cancer* **68**, 493-500, 1996.
- VLAHOS C. J., MATTER W. F., HUI K. Y., BROWN R. F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**, 5241-48, 1994.
- VOGEL M., KOWALEWSKI H.J., ZIMMERMANN H., JANETZKO A., MARGOLIS R.U., WOLLNY H.E. Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata*. *Biochem J.* **278**, 199-202, 1991.
- WANG L., MATSUSHITA K., ARAKI L., TAKEDA M. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase ameliorates apoptosis induced by hydrogen peroxide in the kidney tubule epithelial cells (NRK-52E). *Nephron.* **91**, 142-47, 2002.
- WEI Y.Q., ZHAO X., KARIYA Y., FUKATA H., TESHIGAWARA K., USHIDA A. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res* **54**, 4952-57, 1994.

- WELDIN J., JACK R., DUGAW K., KAPUR R.P. Quercetin, an over the counter supplement, causes neuroblastoma-like elevation of plasma homovanilic acid. *Pediatr. Dev. Pathol.* **6**, 547-51, 2003.
- WILLIAMS R.J., SPENCER J.P.E., RICE-EVANS C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* **36**, 838-49, 2004.
- WINK M.R., BRAGANHOL E., TAMAJUSUKU A.S.K., CASALI E.A., KARL J., BARRETO-CHAVES M.L., SCHWARTSMANN G., SARKIS J.J.F., BATTASTINI A.M.O. Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem International* **43**, 621-28, 2003a.
- WINK M.R., LENZ G., BRAGANHOL E., TAMAJUSUKU A.S.K., SCHWARTSMANN G., SARKIS, J.J.F., BATTASTINI A.M.O. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Lett.* **198**, 211-18, 2003b.
- YANG C. S., LANDAU J. M., HUANG M. T., AND NEWMARK H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 381–406, 2001.
- YOSHIDA M., YAMAMOTO M., NIKAIDO T. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* **52**, 6676-81, 1992.
- YOU DIM K.A., QAISER M.Z., BEGLEY D.J., RICE-EVANS C., ABBOT N.J. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic. Res.* **36**(5), 592-604, 2004.
- ZIMMERMANN H. 5'- Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* **285**, 345- 65, 1992.
- ZIMMERMANN H. Signaling via ATP in the nervous system. *TINS.* **17**, 420-26, 1994.

ZIMMERMANN H., BRAUM N., KEGEL B., HEINE P. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem. Int.* **32**, 421-25, 1998.

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

8. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre sobrevivência média, características histológicas e maiores lesões genéticas associadas com cada tipo de tumor.	8
Figura 2. Vias de sinalização alteradas por mutações em gliomas humanos.	11
Figura 3. Vias de parada do ciclo celular controladas por INK4A gene.	11
Figura 4. Funções do ATP liberado no terminal nervoso e sua completa hidrólise até adenosina no espaço extracelular.	15
Figura 5. Estrutura do flavonol quercetina.	20
Figura 6. Sumário do metabolismo celular da quercetina e de seus metabólitos <i>O</i> -metilados em fibroblastos e possíveis vias de sinalização moduladas por essas substâncias.	21
Figura 7. Fitoquímicos da dieta que bloqueiam ou suprimem múltiplos estágios da carcinogênese.	22

9. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos celulares do sistema nervoso central e tumores associados.....	7
Tabela 2. Características intrínsecas as células tronco e aos gliomas.	7
Tabela 3. Nomenclatura e preferência de substratos dos membros da família E-NTPDase em vertebrados.....	16