

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

O SILENCIAMENTO DA ECTO-5'-  
NUCLEOTIDASE/CD73 ALTERA A  
PROGRESSÃO DE GLIOMAS

Luís Felipe Ingrassia Campesato

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini  
Co-orientador: Prof. Dr. Guido Lenz

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

Porto Alegre

2010

*"Há um tempo em que é preciso abandonar  
as roupas usadas que já têm a forma do  
nosso corpo e esquecer os nossos caminhos  
que nos levam sempre aos mesmos lugares...  
é o tempo da travessia, e se não ousarmos  
fazê-la teremos ficado, para sempre, à  
margem de nós mesmos".*

*(Fernando Pessoa)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, um grande agradecimento aos meus orientadores, Ana e Guido, por me aceitarem de braços abertos como aluno e orientado, sem ao menos me conhecerem direito...mesmo assim, me depositaram muita confiança;

ao pessoal do laboratório do Guido, da biofísica, pela colaboração, parceria e paciência também, especialmente Patilu e Japa;

a algumas pessoas do departamento de Bioquímica, como a Sílvia, o Léo, a Dani do 24, Mestre Rudi, todas gurias do Tadeu (as Tadinhas), dentre outros, que deram muita força pro trabalho acontecer e sempre deram uma mão quando precisei;

à galera do 22 em geral, todos grandes amigos, um grupo com um ótimo ambiente de trabalho...pelas muitas besteiras e risadas, mas também, com certeza, por todo aprendizado que tive com vocês...foi "eXelente"!

um salve pra gurizada de fé, Rafael, Fabrício e Bernardo, todos, irmãos que fiz sem dúvidas!!

ao meu amor, Cristina, que me ajudou sempre, em tudo, uma pessoa especial e única...me deu força e soube me tolerar nos momentos difíceis...sem palavras!!

e à minha família...que sem ela, não estaria conquistando isso hoje!! sempre me incentivou, mesmo sem entender muito bem o que eu fazia, e me deu toda base que precisei, amo todos vocês demais...

## RESUMO

O glioblastoma multiforme (GBM) é um tipo de tumor bastante agressivo, que apresenta uma elevada taxa de proliferação e um comportamento altamente invasivo. A ecto-5'-nucleotidase (e5NT/CD73) é uma enzima expressa de forma bastante ampla, a qual age na hidrólise do AMP extracelular, com consequente formação de adenosina, molécula com diversas funções celulares. Além da função enzimática, foi mostrado que a e5NT/CD73 também exerce importante papel na interação célula-célula e célula-matriz. Muitas evidências apontam para funções de promoção tumoral desempenhadas pela e5NT/CD73, a qual se apresenta expressa em altos níveis em diferentes tumores. No presente estudo caracterizamos o papel desempenhado pela e5NT/CD73 no crescimento de GBM *in vitro* e *in vivo* através do silenciamento de sua expressão e atividade em células de glioma de rato C6. A e5NT/CD73 foi silenciada por RNA de interferência estável através de lentivírus e o silenciamento foi caracterizado por métodos de imunofluorescência e atividade enzimática. Além disso, investigamos parâmetros de malignidade *in vitro*, como adesão e migração celular. Para uma melhor análise do papel da proteína no crescimento tumoral, implantamos as células C6 silenciadas em um modelo de glioma em ratos. Análises patológicas e imunohistoquímicas usando o marcador nestina foram realizados. Foram obtidos dois clones silenciados de forma estável, C6-c54 e C6-c56, os quais tiveram uma significativa redução na expressão e atividade da e5NT/CD73. Foi observada uma significativa alteração no parâmetro de adesão *in vitro* de ambos clones silenciados, e esse efeito deve-se provavelmente à função de adesão exercida pela proteína e não da sua atividade enzimática, uma vez que o uso do inibidor APCP não foi capaz de diminuir a capacidade de adesão das células wt. Além disso, o implante das células silenciadas não foi capaz de gerar uma massa tumoral *in vivo*, o que foi confirmado posteriormente por análise imunohistoquímica. Não obstante, todos tumores C6 wt cresceram com todas características histopatológicas de GBM. O crescimento dos tumores C6 não foi bloqueado pela co-injeção com o inibidor enzimático APCP. Desse modo, nossos resultados corroboram outros dados da literatura que indicam um papel crucial da sinalização purinérgica na progressão de GBM. Estudos complementares são necessários para o estabelecimento de novas e mais eficazes terapias contra esses tumores, utilizando a e5NT/CD73 como alvo.

Palavras-chave: Gliomas; ecto-5'-nucleotidase/CD73; adenosina; silenciamento por RNAi; modelo de implante *in vivo*.

## ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is a very aggressive tumor that presents a high proliferative and invasive behavior. Ecto-5'-nucleotidase (e5NT/CD73) is a widely expressed enzyme that hydrolyses extracellular AMP, producing adenosine, an important molecule in several cell functions. Besides that, e5NT/CD73 has been shown to exert an important role in cell-cell and cell-matrix interactions. Several evidences suggest that e5NT/CD73 has tumor-promotion functions, being up-regulated in several tumors. In this study we aimed to better characterize the role of e5NT/CD73 in glioma progression by silencing its expression in a rat C6 glioma cells and analyzing the *in vitro* and *in vivo* growth of GBM. Knockdown (KD) of e5NT/CD73 was obtained through stable RNA interference mediated by lentivirus and KD cells were analyzed through immunofluorescence and activity methods such as HPLC and malaquite-green. We also assessed parameters of malignancy *in vitro*, such as cell adhesion and migration. For a deeper investigation, we implanted KD C6 cells in rat striatum and performed pathological and immunohistochemical analyses to assess tumor size and malignancy. Two stable e5NT/CD73 KD clones of C6 glioma cells were obtained, named C6-c54 and C6-c56, and these clones presented a large reduction in expression and AMPase activity of e5NT/CD73. A significant alteration in adhesion parameter of silenced cells was observed *in vitro* possibly due to the loss of the adherence function of e5NT/CD73 *per se*. In addition, e5NT/CD73 KD cells were not able to develop a tumor mass in the striatum of rats, which was confirmed by immunohistochemistry analyses, whereas all rats injected with C6 wt cells developed tumors with all histopathological features of GBM. Tumor growth of C6 wt cells was not blocked by the co-injection with the enzymatic inhibitor APCP. Taken together these results reinforce the crucial involvement of purinergic signaling in the GBM progression. Further studies are necessary to establish new and powerful therapies against these tumors using e5NT/CD73 as target.

Key words: Gliomas; ecto-5'-nucleotidase/CD73; adenosine; knockdown; rat glioma model.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Os Gliomas.....	9
1.2. Modelo Experimental.....	13
1.3. Sistema Purinérgico.....	14
1.4. Receptores Purinérgicos.....	15
1.5. A família das Ecto-nucleotidasas.....	16
1.6. Ecto-5'-nucleotidase/CD73.....	18
1.7. Adenosina.....	19
1.8. Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 e tumores.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
3. CAPÍTULO 1 .....	24
3.1. Knockdown of ecto-5'-nucleotidase/CD73 suppresses TUMOR growth in a rat glioma model.....	25
4. DISCUSSÃO.....	58
5. CONCLUSÕES.....	65
6. PERSPECTIVAS.....	66
8. REFERÊNCIAS.....	67
9. ANEXO 1.....	78
10. ANEXO 2.....	79
11. ANEXO 3.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – adenosina deaminase (*Adenosine deaminase*)

ADP - adenosina difosfato (*Adenosine diphosphate*)

AMP - adenosina monofosfato (*Adenosine monophosphate*)

APCP - 5'- $\alpha,\beta$ -metileno-ADP

ATP - adenosina trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)

CNTF - fator de crescimento neurotrófico ciliar (*Ciliary neurotrophic factor*)

e5NT/CD73 – ecto-5'-nucleotidase/CD73

EGFR - receptor do fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor*)

E-NPPs - ecto- nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (*Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*)

E-NTPDase - ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (*Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase*)

FGF2 - fator de crescimento de fibroblasto 2 (*Fibroblast growth factor- 2*)

GBM – Glioblastoma (previamente conhecido como Glioblastoma Multiforme)

GPI – glicosilfosfatidilinositol (*Glycosylphosphatidylinositol*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (*High performance liquid chromatography*)

IL-2 - interleucina-2 (*Interleukin-2*)

IL-10 - interleucina-10 (*Interleukin-10*)

IL-12 - interleucina-12 (*Interleukin-12*)

INF- $\gamma$  - interferon gama (*interferon gamma*)

RNAi – RNA de interferência

shRNA – RNA em forma de alça curta (*short hairpin RNA*)

MAPK - proteína cinase ativada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MAT – macrófagos associados a tumores (*Tumor-associated macrophages*)

MEC – matriz extracelular

mRNA – RNA mensageiro

OMS – organização mundial da saúde

P1 - receptor purinérgico metabotrópico para adenosina, dividido em quatro subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> e A<sub>3</sub>

P2X - receptor purinérgico ionotrópico

P2Y - receptor purinérgico metabotrópico

p53 - proteína supressora tumoral (*tumor protein p53*)

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*)

PIP3 – fosfatidilinositol (3,4,5)trisfosfato (*Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*)

PKA – proteína cinase A (*protein kinase A*)

PKC – proteína cinase C (*protein kinase C*)

PTEN - homólogo fosfatase e tensina deletado do cromossomo 10 (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*)

SNC – sistema nervoso central

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral- alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

Wt – Wild-Type



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Os Gliomas

Gliomas são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central (SNC), representando aproximadamente 80% entre todos os tumores cerebrais (Sathornsumetee *et al*, 2007). Os gliomas são um tipo de câncer extremamente agressivo, sendo o tempo de sobrevida dos pacientes diagnosticados com esta patologia bastante baixo, de cerca de 3 anos (Argyriou & Kalofonos, 2009), tempo esse que varia de acordo com o grau do tumor apresentado. As principais sintomatologias apresentadas são cefaléia, mudanças cognitivas, convulsões, fraqueza, náusea e vômitos (DeAngelis, 2001; Holland, 2001). A maior incidência desses tumores é em adultos com idade acima dos 40 anos, sendo que, homens são mais frequentemente afetados do que mulheres (Preusser *et al*, 2006). Gliomas são usualmente detectados por tomografia computadorizada e por ressonância magnética (Holland, 2001).

Gliomas são tumores de origem neuroepitelial e são classificados com base na sua morfologia em: astrocíticos, oligodendriais, ependimais e tumores do plexo coróide (Nakada *et al*, 2007). Dentre esses, os mais comuns são os de origem astrocítica, chegando a 85% dos casos (Nakada *et al*, 2007). Além disso, os gliomas foram classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 4 graus de malignidade, do menos (grau I) ao mais agressivo (grau IV), de acordo com alterações histopatológicas apresentadas: atipia nuclear, atividade mitótica,

hiperplasia endotelial e necrose (Kleihues *et al*, 2002). Os de grau I são considerados biologicamente “benignos”, enquanto que os de grau II são malignâncias de baixo grau e longa história clínica (Dell’Albani, 2008). Os gliomas de graus III e IV são tumores bastante malignos e letais em curto período de tempo. Além disso, sabe-se que 50% dos gliomas de grau II tornam-se de graus III e IV em um intervalo de 5-10 anos desde o seu diagnóstico (Dell’Albani, 2008).

**Tabela 1.** Relação entre expectativa de vida e características histológicas nos diferentes graus de glioma (Maher *et al*, 2001).

	Astrocitoma de baixo grau	Astrocitoma anaplásico	Glioblastoma multiforme
	(5-10 anos)	(2-3 anos)	(9-12 meses)
<b>Sobrevida</b>			
<b>Proliferação</b>	+/-	++	+++
<b>Invasão</b>	++	++	+++
<b>Angiogênese</b>	-	-	+++
<b>Necrose</b>	-	-	+++

O Glioblastoma Multiforme (GBM), de grau IV, é a forma mais agressiva de gliomas, sendo que aproximadamente todos pacientes com GBM morrem em um período de até um ano (Daí & Holland, 2001) (Tabela 1). O GBM pode tanto ter origem *de novo*, como ser resultado da progressão de um glioma de baixo grau e raramente gera metástases periféricas (Mourad *et al.*, 2005). Esses tumores são formados por uma massa intraparenquimal heterogênea que evidenciam áreas de necrose e hemorragia. Microscopicamente, o GBM consiste em diferentes tipos celulares: células próprias do glioma, células endoteliais hiperproliferativas, macrófagos/microglia, linfócitos 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 em pseudopaliçada, vasos sanguíneos hipertrofiados no interior e em áreas adjacentes ao tumor e grande pleomorfismo nuclear (Daí & Holland, 2001; Sanai *et al*, 2005). A taxa de proliferação de GBM é cerca de 2 a 5 vezes maior que de gliomas de grau III (Nakada, 2007). Uma importante característica desses tumores é sua habilidade de se infiltrar rapidamente no parênquima cerebral sadio de forma difusa, tornando a eliminação cirúrgica completa desses tumores virtualmente impossível (Nakada, 2007). Apesar disso, as medidas terapêuticas adotadas são primeiramente ressecção cirúrgica da massa tumoral, seguida de radio e quimioterapia. No entanto, as estratégias terapêuticas adotadas até o momento são paliativas, já que a recorrência desses tumores é inevitável (Nakada, 2007; Sathornsumetee *et al*, 2007).

Diversas alterações na expressão gênica e anormalidades cromossômicas são usualmente encontradas em glioblastomas, e em certos casos essas mutações estão correlacionadas com o grau clínico apresentado. Tais alterações estão envolvidas com genes que codificam proteínas reguladoras de complexas rotas de transdução de sinal envolvidas em funções celulares essenciais, tais como: proliferação, diferenciação, apoptose, adesão, migração e angiogênese (Weinberg, 1996). Dentre as alterações encontradas, podemos citar o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), fator de crescimento neurotrófico ciliar (CNTF), e o gene p53, que é frequentemente mutado (Holland, 2001). Além disso, GBM apresenta geralmente perda de 10q22-25, uma região cromossômica que carrega diversos supressores

tumorais, com destaque para o gene homólogo da fosfatase e tensina, a (PTEN). A deficiência na PTEN, leva ao acúmulo de fosfatidilinositol(3,4,5)trisfosfato (PIP3) e ativação de moléculas de sinalização que são críticas no controle do tamanho da célula, da migração, da proliferação, da diferenciação e morte celular, todos os eventos que estão envolvidos no desenvolvimento normal e também na tumorigênese (Groszer *et al.*, 2006). Mutações de amplificação ou ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) também são encontradas de forma frequente. Praticamente todas essas mutações levam a uma deficiência no controle do ciclo celular, e a correlação dessas com o grau de malignidade tumoral salienta a importância de vias específicas na gênese do glioma.

A principal célula que dá origem ao glioblastoma tem sido determinada há longo tempo como sendo o astrócito, devido a algumas similaridades morfológicas e moleculares, no entanto, esta hipótese está sendo revisada devido à dificuldade de explicar adequadamente a origem de alguns gliomas, como os mistos, que apresentam características de diferentes células (Sanai *et al.*, 2005). Na última década, fortes evidências têm reforçado a teoria de que a grande população de células tronco neurais encontrada nos gliomas poderia estar participando de forma importante na origem desse tipo de tumor, já que são células indiferenciadas que possuem como características a alta habilidade proliferativa, auto-renovação, elevada motilidade, associação com vasos sanguíneos, dentre outras características que poderiam suportar o crescimento tumorigênico (Sanai *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 2007). Um estudo realizado com células isoladas de pacientes com glioblastoma CD133<sup>+</sup>, um marcador de células tronco, mostrou que essas são capazes de desenvolver tumores em cobaias, com características idênticas aos

gliomas humanos (Singh *et al*, 2004). Além disso, foi demonstrado que células tronco neurais e diversos gliomas compartilham a ativação de muitas vias de sinalização. Conseqüentemente, essas células indiferenciadas apresentam diversos comportamentos característicos de gliomas, e podem ser as responsáveis pelo perfil altamente invasivo e o grande potencial de resistência a tratamentos, apresentados por esse tipo de tumor (Figura 1).

Alta motilidade
Diversidade na descendência
Potencial proliferativo robusto
Associação com vasos sanguíneos
Associação com regiões de matéria branca
Perfil imaturo de expressão
expressão de Nestina
expressão de receptor EGF
expressão de PTEN
atividade da via Hedgehog
atividade da Telomerase
atividade da via Wnt

**Figura 1.** Características intrínsecas de Células Tronco Neurais e Gliomas (Sanai *et al*, 2005)

## 1.2. Modelo Experimental

A elucidação dos mecanismos envolvidos na invasividade celular deve aprimorar as terapias para gliomas de modo a não somente remover o tumor primário, mas também eliminar as células que migraram para o parênquima cerebral sadio. O implante de células malignas no cérebro de animais pode demonstrar de forma próxima os mecanismos reais do crescimento tumoral e

possui vantagens sobre modelos mais simplificados, como modelos *in vitro*, nos quais não há reações inflamatórias e vasculares envolvidas (Grobben *et al*, 2002).

A linhagem altamente proliferativa de glioma de rato C6 foi originalmente obtida pela indução em ratos Wistar-Furth pela exposição a N,N'-nitrosometiluréia (Benda *et al*, 1968), e é morfológicamente similar ao GBM quando implantada no cérebro de ratos, apresentando características como regiões de necrose e hemorragia, e diversidades genéticas como deleções, ampliações e mutações de nucleotídeos (Holland, 2000). Além disso, a linhagem C6 tem sido utilizada como modelo *in vitro* para estudo de gliomas em diversos trabalhos (Grobben *et al*, 2002). Dessa forma, no presente estudo nós utilizamos a linhagem C6 de glioma de rato como modelo experimental tanto para estudos *in vitro* quanto *in vivo* através do implante das mesmas no cérebro de ratos.

### 1.3. Sistema Purinérgico

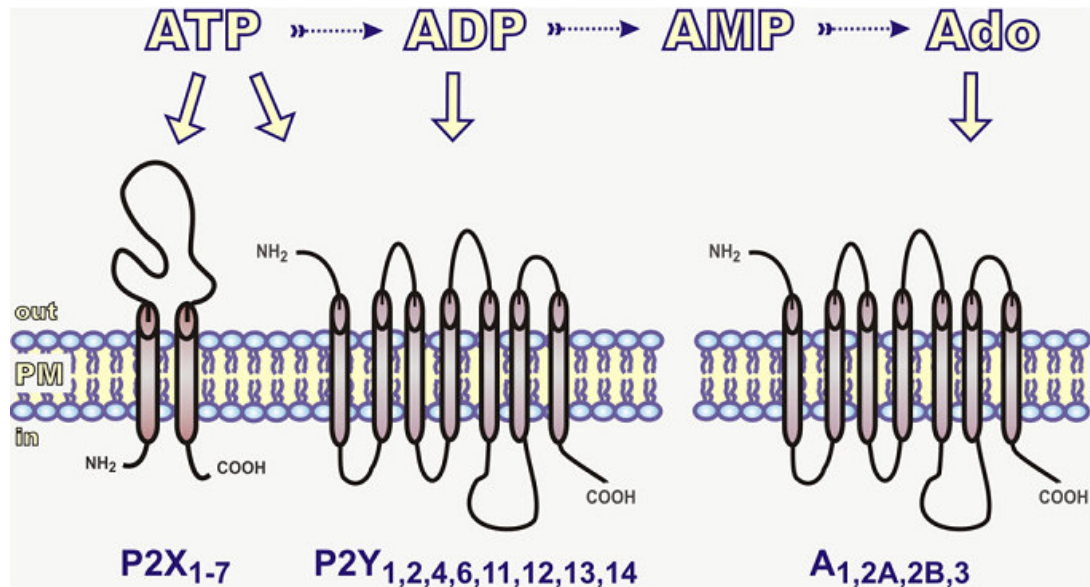
O ATP e outros nucleotídeos e nucleosídeos são encontrados em praticamente todo sistema biológico, onde produzem efeitos tanto por mecanismos intra quanto extracelulares. O ATP intracelular é primariamente utilizado em processos que requerem energia, como transporte ativo, motilidade celular e biossíntese, enquanto que o ATP extracelular é considerado uma molécula sinalizadora potente (Yegutkin, 2008). No entanto, esse conceito de que o ATP extracelular é um importante sinalizador levou algum tempo para ser aceito (Burnstock, 2006). Atualmente, a sinalização purinérgica está muito bem estabelecida através não somente nos efeitos rápidos que incluem entre outros, a

neurotransmissão, contração do músculo liso, resposta imunológica, inflamação, agregação plaquetária e dor (Ravelic & Burnstock, 1998), mas também em mecanismos de que incluem a proliferação, diferenciação e apoptose em uma ampla variedade de tecidos (White & Burnstock, 2006). Todos esses efeitos são desencadeados através da ativação de receptores específicos, os purinoreceptores, os quais ativam diferentes vias de sinalização levando ao controle de diversas atividades celulares.

#### 1.4. Receptores Purinérgicos

Existem duas famílias de receptores já clonadas e caracterizadas, que possuem afinidade para diferentes nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, os chamados receptores P1 e P2 (Figura 2). Os receptores P1 possuem afinidade com a adenosina e são divididos em 4 subtipos: A1, A2a, A2b e A3, sendo todos eles acoplados à proteína G. Já os receptores P2 demonstram grande preferência por nucleosídeos di- e trifosfatados, como ATP e ADP, consistindo em duas grande famílias, os P2X e os P2Y (Novak, 2003). Os P2X são considerados receptores ionotrópicos, geralmente sensíveis ao ATP e induzem um grande influxo celular de cátions, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , por formarem poros na membrana plasmática. Já foram clonados sete diferentes exemplares dentro desta família (P2X<sub>1</sub>- P2X<sub>7</sub>). Os P2Y são receptores metabotrópicos por apresentarem-se acoplados à proteína G. As vias de sinalização intracelulares, desencadeadas pela sensibilização destes receptores, podem envolver a ativação ou inibição de inúmeras proteínas importantes como a PKC, adenilato ciclase, PKA, MAPK e ainda, induzir a expressão gênica das mesmas. São identificados oito membros

pertencentes à família dos P2Y (P2Y<sub>1,2,3,4,6,11,12,13</sub> e <sub>14</sub>) e são sensíveis à purinas e pirimidinas di- e trifosfatadas (Zimmermann, 2006; Fields & Burnstock, 2006).



**Figura 2.** Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares e seus respectivos receptores (Yegutkin, 2008).

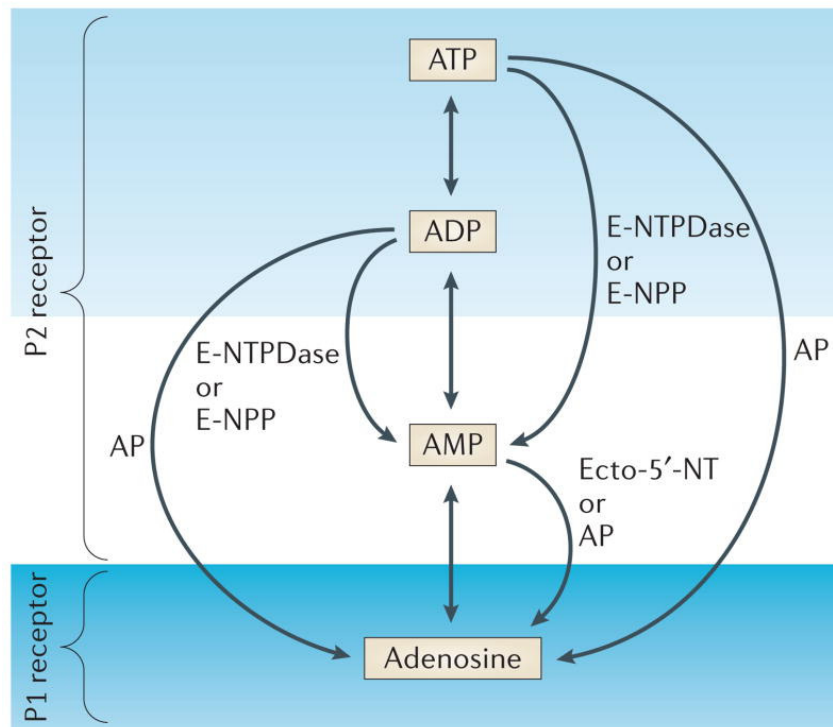
### 1.5. A Família das Ecto-Nucleotidases

Após a sua liberação no meio extracelular e sua interação com seus respectivos receptores, os nucleotídeos são metabolizados a seus nucleosídeos correspondentes pela ação de ectoenzimas, conhecidas como ectonucleotidases, as quais são responsáveis por regular a concentração de nucleotídeos e nucleosídeos e, conseqüentemente, seus efeitos biológicos (Zimmerman, 1994). As enzimas que compõem a classe nas ectonucleotidases são: E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfatodifosfodrolase), as E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase) e as ecto-fosfatases alcalinas, que atuam degradando o ATP e o ADP, e a ecto-5'-nucleotidase/CD73 (e5NT/CD73), que é a



enzima que catalisa a última etapa dessa via, hidrolisando o AMP até adenosina (Zimmermann, 2001). Essa adenosina liberada pode sofrer subsequente degradação a inosina pela ação da enzima adenosina deaminase ou ainda ser captada pelas células através de transportadores bidirecionais, constituindo a via de salvação das purinas.

Os membros da família das E-NTPDases constituem uma classe de ectoenzimas ancoradas à membrana plasmática via domínios hidrofóbicos, com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Essas enzimas são caracterizadas entre outras funções pela sua capacidade de hidrolisar nucleotídeos tri- e difosfatados (Plesner, 1995). Em mamíferos, já foram clonados e classificados 8 membros dessa família de ectoenzimas, nomeados NTPDase1-8, os quais apresentam uma ampla diversidade de preferência por substrato (Figura 3).



**Figura 3.** Enzimas envolvidas na hidrólise dos nucleotídeos extracelulares (Fields & Burnstock, 2006).

## 1.6. Ecto-5'-Nucleotidase/CD73

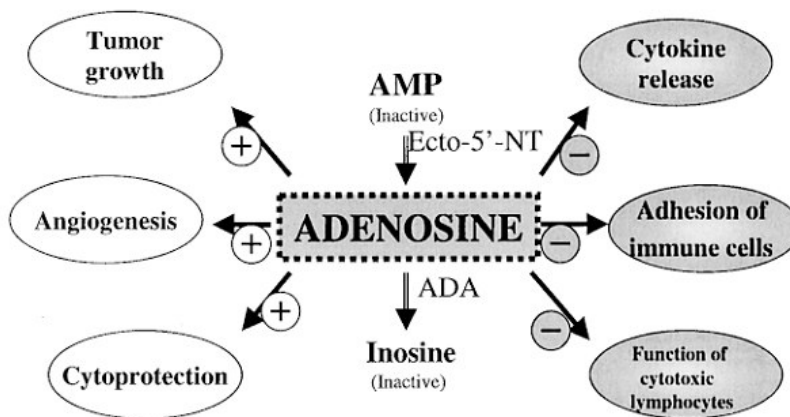
Como foi anteriormente apresentado, o AMP resultante da hidrólise do ATP e do ADP pela ação das E-NTPDases é subsequentemente hidrolisado pela ação da ecto-5'-nucleotidase/CD73 (e5NT/CD73) até adenosina. Essa ectoenzima é um homodímero ligado à membrana plasmática através de uma âncora lipídica com glicosilfosfatidilinositol (GPI), e está localizada em microdomínios de membrana conhecidos como *lipid rafts*, e possui seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Várias formas desta enzima têm sido descritas, mas apenas duas delas, a forma citosólica (Sala-Newby *et al.*, 1999) e a forma associada à membrana plasmática (Zimmermann, 1992) parecem participar efetivamente na formação de adenosina. A enzima citosólica produz adenosina que pode ser liberada das células para exercer seus efeitos farmacológicos, sendo que sua presença e função em outros tecidos além do cardíaco e cerebral permanece por ser estabelecida. Por outro lado, a enzima ligada à membrana (e5NT/CD73) é amplamente encontrada em vários tecidos. Estudos de localização detectaram a e5NT/CD73 em fígado, intestino, linfócitos e no cérebro, onde foi identificada como um marcador glial e indicadora de desenvolvimento, regeneração e plasticidade (Ludwig *et al.*, 1999). Essa enzima é um ponto chave na via das ectonucleotidases, sendo a principal fonte enzimática de adenosina no meio extracelular (Zimmermann, 1992). Sua atividade catalítica é potencializada por cátions divalentes, principalmente o  $Mg^{2+}$ , e inibida por ADP, ATP e 5'- $\alpha,\beta$ -metileno-ADP (APCP), um análogo não hidrolisável do ADP. Além da e5NT/CD73, a adenosina deaminase (ADA), a qual converte adenosina em inosina, também é uma enzima

fundamental no controle da concentração de adenosina presente no meio extracelular (Robson *et al*, 2006).

A e5NT é também denominada como CD73 por ser altamente expressa por linfócitos B e T, constituindo um marcador de maturação para estas células (Sunderman, 1990). Outras funções não enzimáticas são atribuídas a esta proteína, como na adesão célula-célula e com proteínas da matriz extracelular, como laminina e fibronectina (Zimmermann, 1992; Airas *et al*, 1997). Além disso, foi mostrada uma participação da e5NT/CD73 na indução de vias de sinalização intracelulares em linfócitos T (Resta & Thompson, 1997). Essa enzima pode ainda ser encontrada na forma solúvel, após sofrer clivagem no segmento de ligação do GPI (Zimmermann, 2000).

### 1.7. Adenosina

A adenosina, um nucleosídeo purínico, age como uma molécula regulatória de funções celulares e é presente de forma ubíqua em vários sistemas biológicos, exercendo seus efeitos através da sua interação com os receptores P1. É um metabólito natural, que tem papel em diversos processos fisiológicos e patológicos, tais como na inibição da agregação plaquetária, cardioproteção pós-isquemia, vasodilatação, ativação de mastócitos e lipólise (Wang *et al*, 2007). Além disso, a adenosina possui importantes efeitos na angiogênese, citoproteção e imunossupressão, bem como no controle do crescimento, maturação e diferenciação celular (Spychala, 2000). Nos últimos anos, seu papel como molécula pró-tumoral vem sendo explorado de forma intensa (Fig. 4).



**Figura 4.** Funções pró-tumorais da adenosina (Spychala, 2000).

#### 1.8. Ecto-5'-Nucleotidase/CD73 e tumores

A e5NT/CD73 é altamente expressa na maioria dos tumores sólidos e seu nível de expressão está correlacionado com a neovascularização, invasividade e ocorrência de metástases, características que levam à diminuição da sobrevivência dos pacientes (Spychala, 2000). Altos níveis de e5NT/CD73 estão presentes em diversos tipos de carcinomas, tais como os de cólon, pulmão, pâncreas, ovário (Su *et al*, 2001), mama (Wang *et al*, 2008) e gliomas (Bardot *et al*, 1994; Fenoglio *et al*, 1997; Bavaresco *et al*, 2008).

Recentemente foi mostrado que a atividade da e5NT/CD73 está estreitamente relacionada com características tumorais malignas de invasão e propagação em tumores. A superexpressão de e5NT/CD73 aumentou a adesão, migração e invasão de células de tumores de mama (Wang *et al*, 2008), enquanto que seu silenciamento por RNA de interferência (RNAi) diminuiu significativamente esses parâmetros de malignidade (Zhi *et al*, 2007).

Além disso, alguns pesquisadores realizaram uma análise da transição transcricional existente em diferentes tumores quando no seu estado dormente e no seu estado de alta atividade proliferativa e com fenótipo angiogênico. Observou-se que alguns genes participam efetivamente nesse processo de transição, dentre eles está o gene da e5NT/CD73, o qual torna-se superexpresso na fase proliferativa (Almog *et al*, 2009; Johnston *et al*, 2007). Experimentos realizados com linhagens de células de melanoma mostraram que quanto maior o grau do tumor, mais intensa era a expressão da e5NT/CD73, corroborando a participação dessa proteína na malignidade tumoral (Sadej *et al*, 2006).

Esse papel da e5NT/CD73 na progressão tumoral ocorre tanto por sua ação enzimática de produção da adenosina, a qual já foi demonstrada ter papel pró-tumoral atuando na estimulação do crescimento e angiogênese, além da supressão da resposta imune contra as células tumorais (Spychala, 2000), mas também devido a sua interação direta com proteínas da matriz extracelular, participando nos processos de adesão e migração, que são essenciais pra invasão e metástase tumoral (Navarro *et al*, 1998).

Por ser uma proteína reconhecidamente envolvida no processo proliferativo em células tumorais, sugere-se que a e5NT/CD73 possa ser uma forte candidata a marcador de agressividade (Spychala *et al*, 2004) e de progressão tumoral além de um potencial alvo terapêutico (Zhou *et al*, 2007).

Dados publicados pelo nosso laboratório reforçam a hipótese que alterações na via de sinalização purinérgica possam estar envolvidas na malignidade de tumores, mais precisamente de gliomas. Linhagens de gliomas apresentam uma inversão no metabolismo extracelular de nucleotídeos, exibindo

uma baixa atividade ATPásica e uma elevada atividade AMPásica, comportamento oposto às células análogas normais, os astrócitos (Wink *et al* 2003). Mostramos também que o tratamento com ATP e adenosina induziu estímulo proliferativo em diferentes culturas de gliomas (Morrone *et al*, 2003). Em recente trabalho do nosso grupo de pesquisa, foi mostrado que a atividade da e5NT/CD73, bem como a expressão de seu mRNA e proteína, se elevam de acordo com o aumento da confluência celular nas linhagens de glioma estudadas, o que indica dessa forma seu envolvimento no processo de proliferação tumoral (Bavaresco *et al*, 2008).

Desse modo, é de alta relevância o estudo dos fatores envolvidos com a malignidade tumoral, bem como a compreensão dos papéis desempenhados pelos mesmos, já que o melhor entendimento da biologia tumoral permite a identificação de novos alvos terapêuticos. Assim, em continuidade aos estudos anteriores, no presente estudo procuramos avançar na investigação do papel eNT/CD73 na malignidade dos gliomas.

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Diante dos dados apresentados, o presente trabalho visa investigar o efeito do silenciamento da e5NT/CD73 na linhagem C6 de glioma de rato em parâmetros de malignidade tumoral *in vitro* e *in vivo*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia do silenciamento por RNAi da enzima através da expressão protéica, por imunofluorescência, e ensaios funcionais, por HPLC e liberação de fosfato inorgânico;
- Analisar o comportamento das células silenciadas em ensaios de malignidade *in vitro* de adesão e migração;
- Investigar o efeito do implante das células silenciadas no crescimento tumoral em um modelo *in vivo*.

3. CAPÍTULO 1:

**KNOCKDOWN OF ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 SUPPRESSES TUMOR  
GROWTH IN A RAT GLIOMA MODEL**

Artigo a ser submetido ao periódico *BMC CANCER*

(Índice de impacto: 3.087)



3.1.

### KNOCKDOWN OF ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 SUPPRESSES TUMOR GROWTH IN A RAT GLIOMA MODEL

Luis Felipe I. Campesato<sup>a</sup>, Elizandra Braganhol<sup>a</sup>, Rafael F. Zanin<sup>a</sup>, Andressa Bernardi<sup>a</sup>, Patrícia Luciana C. Lopez<sup>b</sup>, Emerson Casali<sup>c</sup>, Maria Isabel A. Edelweiss<sup>d</sup>, Guido Lenz<sup>b</sup> and Ana Maria O. Battastini<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Fisiologia e Nutrição Experimental, Centro de Pesquisa, Centro Universitário Metodista do IPA, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Patologia, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

\* Corresponding author:

Dr. Ana Maria Oliveira Battastini, Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS.

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

Telephone: +55 (51) 3308.5554, Fax: +55 (51) 3308.5535,

E-mail: [abattastini@gmail.com](mailto:abattastini@gmail.com)

## ABSTRACT

**Background:** Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive tumor of the central nervous system that present a high proliferative and invasive behavior. Ecto-5'-nucleotidase (e5NT/CD73) is a widely expressed enzyme that hydrolyses extracellular AMP, producing adenosine, an important molecule in several cell functions. Besides that, e5NT/CD73 has been shown to exert an important role in cell-cell and cell-matrix interactions. Several evidences suggest that e5NT/CD73 has tumor-promotion functions, being up-regulated in several tumors. In this study we aimed to better characterize the role of e5NT/CD73 by silencing its expression in C6 rat glioma cell line and analyzing the *in vitro* and *in vivo* glioblastoma growth.

**Methods:** Knockdown (KD) of e5NT/CD73 was obtained through stable RNA interference mediated by lentivirus and KD cells were analyzed through immunofluorescence and enzyme activity methods. We also assessed parameters of malignancy *in vitro*, such as cell adhesion and migration. For a deeper investigation, KD C6 cells were implanted in the striatum of adult Wistar rats and haematoxylin and eosin (H&E) as well immunohistochemical analysis were performed to assess the tumor size and histological malignancy characteristics.

**Results:** Two stable e5NT/CD73 KD clones of C6 glioma cells were obtained, named C6-c54 and C6-c56, and these clones presented a large reduction in expression and AMPase activity of e5NT/CD73. A significant alteration in adhesion parameter of silenced cells was observed *in vitro* possibly due to the loss of the adherence function of e5NT/CD73 *per se*. In addition, e5NT/CD73 KD cells were not able to develop a tumor mass in the brain of rats, which was confirmed by immunohistochemistry analysis, whereas all rats injected with C6 wild-type (wt) cells developed tumors with all characteristics of GBMs. Tumor growth of C6 wt cells was not blocked by the co-injection with APCP, an e5NT/CD73 inhibitor.

**Conclusion:** Taken together these results reinforce the crucial involvement of purinergic signaling in the GBM progression. Further studies are necessary to establish new and powerful therapies against these tumors using e5NT/CD73 as target.

## BACKGROUND

Glioblastoma (GBM, formerly known as Glioblastoma Multiforme) is the most common and destructive primary brain tumor (1). This kind of tumor is characterized by an extremely aggressive behavior, which results in a poor prognosis for patients and a median survival of 12 months after diagnosis (2). Their fast-growing and angiogenic phenotype as well as their great potential to invade surrounding normal brain tissue limit the therapeutic options and the efficacy of current treatments (1,3). Therefore, the elucidation of mechanisms involved in GBM progression and the identification of promising targets can establish new and powerful therapeutical strategies.

Nucleotides represent an important and ubiquitous class of extracellular messengers that mediate a variety of biological functions, including cell death and proliferation by activating purinergic receptors (4). The nucleotide receptor-mediated cell communication is controlled by ecto-nucleotidases, such as ectonucleoside-triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) and ecto-5'-nucleotidase/CD73 (e5NT/CD73), which can efficiently hydrolyze ATP to adenosine in the extracellular space (5).

Ecto-5'-nucleotidase (e5NT) also known as CD73, is a widely distributed 70-kDa molecule localized at the external side of the plasma membrane at lipid rafts through a glycosyl-phosphatidylinositol link (6). This enzyme catalyzes the hydrolysis of extracellular nucleoside monophosphates to respective nucleosides (e.g. AMP  $\rightarrow$  adenosine), and is the best-characterized enzymatic source of

extracellular adenosine (7). Besides the catalytic function, e5NT/CD73 has also been described as an important molecule involved in cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interaction, (8) as well as in the signaling induction of T lymphocytes (9).

A large body of evidence suggests that e5NT/CD73 and its enzymatic product, adenosine, have tumor-promotion functions (reviewed in ref. 10). A high level of e5NT/CD73 expression has been reported in many human solid tumors, such as colon, lung, pancreas, ovary (11), melanomas (12) and breast carcinomas (13) and e5NT/CD73 expression is correlated with shorter patient survival time (10). Recently, authors have demonstrated that e5NT/CD73 over-expression increased adhesion, migration and invasion properties in a breast cancer line (14), while the RNAi silencing of this protein decreased significantly the same parameters (13). Adenosine accumulates in solid tumors at high concentrations, and has been shown to stimulate tumor growth and angiogenesis through activation of P1 receptors and to inhibit cytokine synthesis, cell spreading, adhesion of immune cells to the endothelial wall, and the function of T-cells, macrophages, and natural killer cells (10).

Previous studies published from our research group indicate a strong involvement of purinergic signaling in the growth and progression of gliomas. Glioma cell lines present a striking difference in the extracellular nucleotide metabolism, exhibiting a low ATPase and a high AMPase activity, while normal astrocytes have high ATPase, low AMPase activity (15). Besides that, ATP and adenosine induce proliferation of several glioma cell lines (16). Moreover, increasing cell confluence and culture times led to an increase in e5NT/CD73

activity and expression in two different glioma cells (17). In accordance with the importance of e5NT/CD73 and adenosine on tumor promotion, we have also shown that the treatment with APCP ( $\alpha,\beta$ -methylene ADP), a synthetic inhibitor of this enzyme, and AMP significantly reduced glioma cell proliferation (17). These data support the notion that the increase of ecto-5'-NT/CD73 expression/activity may have a crucial role in the GBM development for at least two different reasons: (a) as adhesion molecule *per se* and (b) as the major source of extracellular adenosine.

In the present report we set out to better characterize the role of e5NT/CD73 in *in vitro* and *in vivo* GBM growth by silencing its expression in C6 rat glioma cells. Our results reveal that the silencing of e5NT/CD73 decreased the glioma cell adhesion *in vitro* and decreased drastically the tumor growth *in vivo*. These results reinforce the involvement of purinergic signaling in the GBM progression.

## METHODS

### Cell Culture

The C6 rat glioma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA), grown in culture flasks and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 1% DMEM, 8.39 mM HEPES (pH 7.4), 23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% fungizone, 0.5 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco BRL) and supplemented with 5% (v/v) fetal bovine

serum (FBS; Cultilab, Brazil). Cells were kept at a temperature of 37°C, humidity of 95% / 5% CO<sub>2</sub> in air.

### **Stable RNA Interference**

Lentiviruses were produced by co-transfecting e5NT/CD73 Mission RNAi plasmids (Sigma-Aldrich) with the helper viral constitutive plasmids pRSVREV, pVSV-G and pMDLgRRE (18) in sub-confluent Hek293T cells with Superfect Reagent (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. The sh RNA sequences were: **TRCN0000048754 (C6-c54)** 5'-CCICTCAATCATGCGCTTIA-3' and **TRCN0000048756 (C6-c56)** 5'-GCACTGGGAAATCATGAATTT-3'. These shRNAs were designed for the human sequence, and the underlined bases represent mismatches with the rat sequence. The c56 has no mismatches. As a transduction control we used a plasmid containing GFP. Two days following transfection, viral supernatant was collected every 2 days during 1 week, filtered through a 0.45 µm membrane and used immediately or stored at -80°C. One milliliter of medium containing the virus was added to C6 wt sub-confluent cells in 24-well plate cultures (1.5 x 10<sup>4</sup> cells/well), supplemented with 8 µg/mL of polybrene overnight. About 72 h following viral transduction, cells were selected with puromycin (30 µM) for 10 days, changing the medium every two days. Previous tests showed that these treatment conditions with puromycin completely removed non-transduced cells (19).

## **Immunofluorescence**

Confluent glioma cell lines seeded in cover slips were fixed in 10% phosphate-buffered formalin mixed with cold acetone and washed three times for 5 min in PBS. Cells in cover slips were then incubated in 7% normal goat serum prepared in PBS containing 0.2% Tween-20 for 45 min at room temperature. After that, cells were incubated for 90 min at room temperature with the following primary antibody: ecto-5'-nucleotidase (rNu-9<sub>L</sub>I<sub>5</sub>; 1:2000; a kind gift of Dr. J. Sévigny, Laval University, Canada), each diluted in 1% normal goat serum prepared in PBS containing 0.2% Tween-20. They were then incubated with Alexa488-conjugated goat anti-rabbit or Alexa633-conjugated goat anti-mouse (1:1000) for 60 min at room temperature. Sections were counterstained with DAPI blue (1:10000) for 5 min at room temperature. Controls using pre-immune antibodies were performed.

## **Ecto-nucleotidases assay**

The nucleotide hydrolysis was assayed through the green malachite method as described by Wink et al. (15). Briefly, 24-well plates containing glioma cells were washed three times with incubation medium. The enzymatic reaction was started by the addition of 200  $\mu$ L of incubation medium containing 2 mM  $\text{CaCl}_2$  (for ATP and ADP) or 2 mM  $\text{MgCl}_2$  (for AMP) plus 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES (pH 7.4) and 1 mM of ATP/ADP or 2 mM of AMP, at 37 °C.

After 20 min of incubation for ATP/ADP or 10 min for AMP, the reaction was stopped by taking an aliquot of the incubation medium, which was transferred to eppendorf tubes containing trichloroacetic acid (5% final concentration, w/v) previously placed on ice. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the malachite green method (20), using  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as a Pi standard. The non-enzymatic Pi released from the nucleotide into the assay medium without cells was subtracted from the total Pi released during the incubation, giving net values for enzymatic activity. Specific activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

### **Protein Determination**

Cells in 24-well plates were solubilized with 100  $\mu\text{l}$  NaOH (1.0 M) and frozen overnight. An aliquot was collected and protein was measured by the Coomassie blue method (21) using bovine serum albumin as standard. The protein determinations were carried out in all experiments to verify e5NT/CD73 activity.

### **Analysis of extracellular AMP metabolism by HPLC**

Cellular monolayers were washed three times with incubation medium containing 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM Hepes (pH 7.4). The reaction was started by adding 300  $\mu\text{l}$  of AMP at final concentration of 100  $\mu\text{M}$  in a 24-well plate and different times of incubation (0, 10, 20, 30, 60, 90



and 180 min) at 37°C. The supernatant was collected on ice, centrifuged at 4°C for 30 min at 14,000 × rpm and aliquots of 40 µl were applied to a reversed-phase HPLC system (Shimadzu, Japan) using a C18 Shimadzu column of 12 cm (Shimadzu, Japan) at 254 nm with a mobile phase containing 60 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM tetrabutylammonium chloride (pH 6.0) in 30% methanol according to a previously described method (22). The retention time of standards was used as a parameter for identification and quantification. All incubations were carried out in triplicate and the controls to correct for non-enzymatic hydrolysis of nucleotide were done by incubating the reaction medium in the absence of cells.

### **Cell adhesion assay**

Cells were seeded at density of  $3 \times 10^4$  cells/well in 96-well plates and incubated for 1 h at 37°C with a 5% CO<sub>2</sub> enriched atmosphere. Treatments with DMSO at 1%, APCP at 30 µM or adenosine at 100 µM were added at the time cells were seeded. The non-adherent cells were removed by washing with PBS. Adherent cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min; stained for 10 min with 100 µL 0.5% crystal violet diluted in 20% methanol, which was eluted in 100 µL 10% acetic acid (v/v). The optical density of each well was measured at 570 nm.

### **Cell migration assay**

The migration assay was performed as described by Valster *et al* (23). Briefly, before plating the cells in the 12-well plates, two parallel lines were drawn at the underside of the plates with a Sharpie Marker to mark the areas to be analyzed. Cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$ , and at day of analysis, the monolayer was at approximately 70% confluence. Prior to the experiment, the culture medium was aspirated and replaced with calcium-free PBS to prevent killing of cells at the edge of the wound by exposure to high calcium concentrations. One scratch width was made perpendicular to the marker lines with a yellow P200 pipette tip. This procedure allows to image the entire width of the wound using a 10x objective. Cells were replaced with medium or medium with the respective treatments, DMSO at 1%, APCP at 30  $\mu$ M or adenosine at 100  $\mu$ M. The observation was made using phase contrast microscopy on an inverted microscope. Images were taken at 0, 3, 6, 12 and 24 hours, and analyzed by digitally drawing lines averaging the position of the migrating cells at the wounded edges. The cell migration distance was determined by measuring the width of the wound divided by two and by subtracting this value from the initial half-width of the wound.

### **Glioma implantation**

Cells were cultured to approximately 70% confluence and a total of  $1 \times 10^6$  cells in 3  $\mu$ L DMEM with 5% FBS were injected in the right striatum at a depth of 6.0 mm (coordinates with regard to bregma: 0.5 mm posterior and 3.0 mm

lateral) of male Wistar rats (250–270 g, 8 weeks old) anesthetized by i.p. administration of ketamine and xilazine (24). After 20 days, the rats were decapitated and the entire brain was removed, sectioned and fixed with 10% paraformaldehyde (PFA) in PBS (pH 7.4). All procedures used in the present study followed the Principles of Laboratory Animal Care from NIH and were approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Pathological analysis and tumor volume quantification**

The fixed tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and sections (4  $\mu\text{m}$  thick, paraffin embedded) of each tumor were analyzed by two independent pathologists, blinded for the experimental data. For tumor size quantification, images were captured using a digital camera connected to the microscope and analyzed using Image Tool Software™. The total volume ( $\text{mm}^3$ ) of the tumor was computed by summing the segmented areas and by the multiplication of the slice resolution.

### **Immunohistochemistry**

Paraffin embedded 5- $\mu\text{m}$  formalin fixed tissue sections were mounted on microscope slides. Tissue sections were then dried overnight at 60 °C, dived in xylene and rehydrated with distilled water. Endogenous peroxidase was inhibited by 5% $\text{H}_2\text{O}_2$  in methanol for 15min. Incubation with the anti-nestin (1:200) antibody

was performed overnight at 4°C temperature followed by incubation with secondary antibody and Streptavidin–Avidin–Biotin. The peroxidase reaction was performed using 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB), according to the manufacturer's specifications. Finally, sections were counterstained with Harris hematoxylin.

### **Statistical analysis**

Data were expressed as mean  $\pm$  SD and were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer post-hoc test (for multiple comparisons). Differences between mean values were considered significant when  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

### *Characterization of e5NT/CD73 KD glioma cells*

In this study we investigated the effect of e5NT/CD73 KD in proliferation parameters of GBM. For this purpose we used the C6 rat cell line, and a KD using a lentiviral delivery system of shRNA to e5NT/CD73, leading to a stable silencing of the cell lines. Two clones were produced by using two different shRNA sequences, named C6-c54 and C6-c56. First, we assessed the efficacy of e5NT/CD73 KD through protein expression and enzyme activity parameters. As showed in Figure 1A, the two KD C6 cells exhibited a distinct morphology

compared to C6 wild-type (wt) and the e5NT/CD73 protein expression analysed by immunofluorescence revealed an almost null expression of the e5NT/CD73 protein in both silenced clones (Figure 1B). In addition, the AMPase activity was analysed by malachite green method as well as by HPLC. Both methods indicated that the silencing of e5NT/CD73 also lead to a large reduction in ecto-AMPase activity. The AMPase activity of C6 wt cells was  $73\pm 9$  nmol of Pi/min/mg of protein, while C6-c54 was  $1.4\pm 0.04$  nmol Pi /min/mg of protein and C6-c56  $0.5\pm 0.15$  nmol Pi/min/mg of protein (Figure 2A). To trace the nucleotidase profile of KD cells, we also assessed if there were any alteration in ATPase and ADPase activity in these cells. We observed a small, but significant, decrease in ATPase activity in both C6-c54 and C6-c56 silenced clones comparing to C6 wt (Figure 2B). The extracellular AMP metabolism of KD cells glioma cells was also analyzed by HPLC (Figure 2 C, D, E). In agreement with the results obtained for the AMPase activity measured by Pi release, the extracellular AMP was efficiently metabolized by C6 wt glioma culture. Within 60 min, virtually all the extracellular AMP was metabolized in the presence of intact glioma cells with a subsequent adenosine, inosine and hypoxanthine production (Figure 2C). On the other hand, both clones had a strong decrease in their ability to hydrolyze AMP compared to C6 wt glioma cells. The C6-c54 clone presented a weak e5NT/CD73 activity, showing a little degradation of AMP in the first 30 minutes, with consequent lower production of metabolites (Figure 2D). This may be due to the fact that the shRNA sequence used for this clone was designed to silence human e5NT, and has 6 mismatches when compared to the rat sequence. Less than perfectly paired shRNA can be used to partially silence a gene (25). The C6-c56 clone, in which the shRNA sequence has

a perfect match to the rat sequence, had an almost null AMPase activity, since the quantity of AMP was barely altered in the time of 180 minutes (Figure 2E).

#### *Assessment of in vitro malignancy parameters*

For a characterization of the effect of e5NT/CD73 absence, we analyzed the behavior of KD tumor cells for different parameters of malignancy. The KD of e5NT/CD73 significantly reduced the adherence of cells (Figure 3A), which is a crucial step in tumor expansion. Next, to test the possibility that this noted adhesion decreasing was due to a loss of extracellular adenosine levels, the C6 wt cells were treated with APCP, a competitive inhibitor of e5NT/CD73 (Figure 3A). It was observed that APCP did not alter the attachment property of C6 wt glioma cells. Moreover, the treatment with adenosine did not reverse the decreased adhesion ability of C6-c56 cells (Figure 3A), further suggesting that the protein, rather than its enzymatic activity are responsible for this effect.

Furthermore, we analyzed the influence of e5NT/CD73 KD in cell migration *in vitro*, through a wound-healing assay. However, no significant alteration in this parameter was observed (Figure 3B).

#### *Correlation between e5NT/CD73 activity and tumor size*

For further investigation of e5NT/CD73 role on glioma progression, we used an *in vivo* glioma model previously established (24). C6 wt and KD cells were implanted in the brain of 60 days-old rats and tumors were allowed to grow for 20

days. As previously showed the C6 wt tumors presented all histopathological features of GBM, such as nuclear atypia, mitotic activity, intratumoral hemorrhage, foci of tumor necrosis and parenchymal invasion (24, 26, 27). In some cases, areas of peripheric pseudopalisading delineating the foci of necrosis and lymphocytic infiltration were observed, with occasional formation of edema fluid and neovascularization (Figure 4A). On the other hand, rats implanted with C6-c54 and C6-c56 glioma cells presented mainly reactive gliosis in the brain tissue, not being able to develop a significant and detectable tumor mass. As a control, C6 wt glioma cells with high passages number and consequently low AMPase activity (LA) was also used to implant tumors in the rat brain. In agreement with our hypothesis, e5NT/CD73 activity was directly correlated to tumor size *in vivo*, as we can see in Figure 4B.

In order to evaluate if the KD glioma cells were able to implant but for some reason could not expand and ended extinguished along the time, or if the KD of e5NT/CD73 prevented tumors cells to implant in the rat brain, we performed an immunohistochemical analysis for nestin, a intermediate filament protein involved in the organization of the cytoskeleton and expressed in almost all GBMs. As shown in Figure 5A all C6 wt tumors presented a strong nestin immunoreactivity, while in C6-c54 clone only one of six tumors were positive and in C6-c56 clone none of the six implanted tumors presented immunoreactivity for nestin (Figure 5B). Injection of wt cells lead to a strong nestin staining in peripheric pseudopalisading areas as indicated by the arrow in Figure 5C, which demonstrates the high degree of malignancy presented by wt tumors.

### *Mechanisms involved in the absence of e5NT/CD73 knocked-down tumors*

We decided to investigate the reason why implanted silenced glioma cells were not able to develop tumors in the brain. For that, we implanted C6 wt cells with the competitive inhibitor APCP, to answer if the absence of tumor was happening because of a loss of adenosine around the e5NT/CD73 silenced gliomas. However, no significant difference was noted, and C6 wt tumors were able to grow normally even in the presence of the e5NT/CD73 inhibitor (Figure 6A) suggesting that possibly the presence of the protein and not the enzymatic activity may be main cause of the blockage of gliomas growth.

## DISCUSSION

In our present study we demonstrate a clear correlation between e5NT/CD73 expression and tumor growth in an *in vivo* glioma model. More specifically, cells with low expression of e5NT/CD73 did not generate a detectable tumor mass and cells with intermediary expression, either by using a shRNA with mismatch or by a naturally occurring clone, produces very small tumors. The overall nucleotide hydrolyzing profile of KD cells presented a tenuous decrease in ATPase activity, possibly due to an adaptation of the enzymes responsible for this activity to the drastic reduction in e5NT/CD73 expression. The localized co-expression of the entire ectonucleotidase cascade, including ecto-ATPase, ecto-ADPase and e5NT/CD73 has been previously observed, demonstrating the necessity of a fine and coordinate regulation to control the extracellular levels of



nucleotides and nucleosides (28). Nucleotides can have quite different effects on gliomas. While AMP was shown to inhibit the proliferation of U138-MG glioma cells, acting as a “toxic” molecule for these cells (17), and also has shown an inhibitory effect on the growth of breast cancer cells (29), ADP has a clear pro-growth effect (16).

The majority of gliomas have a very small ATPase and ADPase activity (15). But cells in the gliomas niche, such as astrocytes have a very high ATPase and ADPase activity (15). Therefore, the AMP produced by the degradation of ATP by astrocytes can be hydrolyzed by the gliomas to adenosine that can accumulate in the cancerous tissue and constitute an important mechanism of tumor immune escape and angiogenesis induction (30, 31). Therefore the coordinated action of normal and glioma cells having ecto-nucleotidases on the cell surface clear the extracellular pro-inflammatory factor ATP generating the immunosuppressor adenosine. Among its distinct anti-inflammatory roles, it is believed that adenosine modulates T-cell responses primarily by binding to  $A_{2A}$  receptors on T cells (30). Adenosine can also inhibit pro-inflammatory IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-12, INF $\gamma$  and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  synthesis (10; 32) and stimulate anti-inflammatory IL-10 synthesis. In addition, it is already known that anti-inflammatory phenotype may assist tumor growth by producing various growth factor and pro-angiogenic cytokines (33).

Although the production of adenosine may be one explanation for the importance of e5NT in glioma tumor growth, our *in vitro* and *in vivo* results favor the role of e5NT as an adhesion molecule rather than an enzyme. *In vitro*, the

replacement of adenosine did not reverse the inhibition of adhesive properties of e5NT/CD73 KD cells, and *in vivo*, the co-injection of APCP, a strong inhibitor of e5NT, together with C6 wt cells, did not lead to any alteration in tumor size after twenty days. Although it is possible that the inhibitory effect of APCP on e5NT/CD73 at the moment of glioma implantation was not sufficient to hinder glioma implantation and growth, this evidence also favors the importance of the presence of e5NT as an adhesion molecule rather than an enzyme. Similar evidences that favor functions other than the enzymatic for e5NT were already shown for tumor invasion and metastasis (12,13), supporting the findings presented here.

Cell motility is an essential component of tumor progression, invasion and metastasis, and involves multiple steps such as cell adhesion and migration (12, 13). We have observed a significant decrease in the adhesion ability of e5NT/CD73 KD cells *in vitro*, what is in agreement to previous studies that show a role of CD73 in lymphocyte adhesion to endothelium (34) and that e5NT/CD73 may serve as an adhesion molecule in glioblastoma promoting tumor invasiveness (35). It is well known that e5NT may act in cell adhesion by providing extracellular adenosine and consequently lead to activation of the A1 receptor (36) as well as through an interaction with ECM proteins and cell-cell interactions (8, 37). Again arguing in favor of a non-enzymatic role of e5NT/CD73, inhibition of its enzymatic activity with APCP in wt cells or adding exogenous adenosine in KD cells did not affect cell adhesion, indicating that the alteration in cell adhesion observed in e5NT/CD73 KD cells was not attributable to the lower production of adenosine, but was produced by the presence of the protein on the cell surface.

Cellular migration requires a non-homogeneous adhesion and there is no direct correlation between overall strength of adhesion and migration. Although a role of e5NT/CD73 in migration has been previously described in other tumor cells (12, 13, 38), we did not find any clear difference in migration in the KD clones tested. Furthermore, the distinct morphology presented by KD cells in culture may be due to the alteration of its adhesive properties and a possible rearrangement of cytoskeleton, since e5NT/CD73 has been described to interact with actin filaments (39), and this effect may well impact the mobility of these cells *in vivo*.

The *in vivo* data, using a well established GBM tumor model (24) not involving immunodeficient animals, attests for the importance of e5NT/CD73 in GBM tumor development. While rats implanted with C6 wt cells developed a tumor of size and histopathological features of highly malignant GBM tumors, no tumor mass was observed through HE pathological analysis or nestin immunocytochemistry in the c56 KD clone and only one residual tumor was found in the c54 clone, which expressed a small amount of e5NT. A “dose response” type of result with RNA interference was previously shown for p53 (40) and is one of the advantages of this technology (25), even more when the silencing of a given gene has such a drastic effect as in our case. Accordingly, C6 wt cells with late passages, which have a lower AMPase activity compared to C6 wt in early passages, generated smaller and less malignant tumors confirming the correlation of tumor growth and e5NT/CD73 activity.

In summary, our results show consistent evidences of the role performed by e5NT/CD73 in glioma progression, since the protein silencing significantly reduced adhesion *in vitro* and tumor growth *in vivo*. We propose that targeting tumor-

derived CD73 may constitute an effective means in combination with other therapeutic strategies to decrease tumor malignant potential, enhance endogenous anti-tumor immune responses and improve the treatment of GBMs.

## REFERENCES

1. Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME. **Molecular targets of glioma invasion.** *Cell Mol Life Sci* 2007. 64:458-478.
2. Argyriou AA, Kalofonos HP. **Molecularly targeted therapies for malignant gliomas.** *Mol Med* 2009, **15**(3-4):115-22.
3. Sathornsumetee S, Reardon D, Desjardins A, Quinn J, Vredenburgh JJ, Rich JN. **Molecularly targeted therapy for malignant gliomas.** *Cancer* 2007, **110**:13-24.
4. Burnstock G. **Purinergic signalling: past, present and future.** *Braz J Med Biol Res* 2009, **42**(1):3-8.
5. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. **The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance.** *Purinergic Signal* 2006, **2**(2):409-30.
6. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, Zhou P. **Ecto-5-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2008, **134**(3):365-72.
7. Zimmermann H. **5'- Nucleotidase: molecular structure and functional aspects.** *Biochem. J* 1992, **285**:345- 65.

8. Stochaj U, Dieckhoff J, Mollenhauer J, Cramer M, Mannherz HG. **Evidence for the direct interaction of chicken gizzard 5'-nucleotidase with laminin and fibronectin.** *Biochim Biophys Acta* 1989, **992**(3):385-92.
9. Resta R, Thompson LF. **T cell signalling through CD73.** *Cell Signal* 1997, **9**(2):131-9.
10. Spychala J. **Tumor-promoting functions of adenosine.** *Pharmacol. Ther* 2000, **87**:161-73.
11. Su AI, Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, Dimitrov P, Lapp H, Schultz PG, Powell SM, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Hampton GM. **Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures.** *Cancer Res* 2001, **61**(20):7388-93.
12. Sadej R, Spychala J, Skladanowski C. **Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of melanoma.** *Mel Res* 2006, **16**:213-222.
13. Zhi X, Chen S, Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, Yin L. **RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion.** *Clin Exp Metastasis* 2007, **24**:439-448.
14. Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, Yin L, Shao Z, Ou Z. **Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix.** *Cancer Biol Ther* 2007, **6**(3):426-31.
15. Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Schwartzmann G, Sarkis JJF, Battastini AMO. **Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines.** *Cancer Lett* 2003, **198**:211-18.

16. Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, Bernardi A, Schwaratzmann G, Rodnight R, Lenz G. **Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines.** *J Neuro-Oncology* 2003, **64**:211-218.
17. Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A, Battastini AMO. **The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation.** *Mol Cell Biochem* 2008, **319**(1-2):61-8.
18. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. **A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.** *J Virol* 1998, **72**(11):8463-71.
19. Tamajusuku AS, Villodre ES, Paulus R, Coutinho-Silva R, Battastini AM, Wink MR, Lenz G. **Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma.** *J Cell Biochem* 2010, **109**:983-991.
20. Chan KM, Delfert D, Junger KD. **A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity.** *Anal Biochem* 1986, **157**:375-380.
21. Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
22. Voelter W, Zech K, Arnold P, Ludwig G. **Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography.** *J Chromatogr* 1980, **199**:345-54.

23. Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M. **Cell migration and invasion assays.** *Methods* 2005, **37**(2):208-15.
24. Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Battastini AMO. **In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model.** *BMC Cancer* 2006, **6**:226.
25. Lenz G. **The RNA interference revolution.** *Braz J Med Biol Res* 2005, **38**:1749-1757.
26. Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppes D, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AM. **Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth.** *Cancer Sci* 2009, **100**(8):1434-42.
27. Bernardi A, Braganhol E, Jäger E, Figueiró F, Edelweiss MI, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AM. **Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model.** *Cancer Lett* 2009, **281**(1):53-63.
28. Braun N, Zimmermann H. **Association of ecto-5'-nucleotidase with specific cell types in the adult and developing rat olfactory organ.** *J Comp Neuro* 1998, **393**(4):528-37.
29. Mazurek S, Michel A, Eigenbrodt E. **Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates.** *J Biol Chem* 1997, **272**(8):4941-52.
30. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S,

- Sitkovsky M. **A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(35):13132-7.
31. Grant MB, Tarnuzzer RW, Caballero S, Ozeck MJ, Davis MI, Spoerri PE, Feoktistov I, Biaggioni I, Shryock JC, Belardinelli L. **Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells.** *Circ Res* 1999, **85**(8):699-706.
32. Haskó G, Csóka B, Németh ZH, Vizi ES, Pacher P. **A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation.** *Trends Immunol* 2009, **30**(6):263-70.
33. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. **Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas.** *J Pathol* 2008, **216**(1):15-24.
34. Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S. **CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73.** *J Exp Med* 1995, **182**(5):1603-8.
35. Fenoglio C, Necchi D, Civallero M, Ceroni M, Nano R. **Cytochemical demonstration of nitric oxide synthase and 5' nucleotidase in human glioblastoma.** *Anticancer Res* 1997, **17**:2507-2511.
36. Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. **Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors.** *J Immunol* 1992, **148**(7):2201-6.



37. Airas L, Niemela J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S. **Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells.** *J Cell Biol* 1997, **136**:421-431.
38. Zhou TT, Zhou P. **Crucial role for ecto-5'-nucleotidase(CD73) in invasion and migration of human breast cancer cell lines.** *Chin J Pathophysiol* 2006, **22**:360–364.
39. Vedeler A, Pryme IF, Hesketh JE. **Insulin induces changes in the subcellular distribution of actin and 5'-nucleotidase.** *Mol Cell Biochem* 1991, **108**(1):67-74.
40. Hemann MT, Fridman JS, Zilfou JT, Hernando E, Paddison PJ, Cordon-Cardo C, Hannon GJ & Lowe SW. **An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes *in vivo*.** *Nature Genetics* 2003, **33**,396-400.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Characterization of e5NT/CD73 KD.** (a) Representative photomicrographs of C6 wt, C6-c54 and C6-c56 cells in culture (magnification X100). (b) Immunofluorescence staining of cells in culture for e5NT/CD73 (red) and DAPI (blue). Magnification x200. No staining was seen in negative controls incubated only with pre-immune antibodies (insert).

**Figure 2. Assessment of e5NT/CD73 KD by enzymatic activity.** (a) AMPase activity and (b) ATP/ADPase activity of wt and KD clones. Specific activity values are expressed as nmol Pi/min/mg protein. Values represent means  $\pm$  SD from three independent experiments. (c) C6 wt (d) C6-c54 and (e) C6-c56 in 24-well plates were incubated with 100  $\mu$ M of AMP as described in methods. An aliquot of the supernatant was withdrawn at 0, 10, 20, 30, 60, 90 and 180 min and the presence of AMP, adenosine, inosine and hypoxanthine were determined after separation by HPLC. Data are mean values from two experiments carried out in triplicates.  $P < 0.05$  as determined by ANOVA, followed by Tukey–Kramer test. \*Significantly different from control.

**Figure 3. Effect of e5NT/CD73 KD in cell adhesion and migration *in vitro*.** Cell adhesion (a) and migration (b) were evaluated as described in methods. The values represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey–Kramer test). \*Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

**Figure 4. Correlation between e5NT/CD73 expression and tumor size *in vivo*.**

(a) C6 wt, C6 LA wt (late passage gliomas cells which spontaneously presented a low e5NT activity), C6-c54 and C6-c56 cells were implanted in the rat brain and the tumor size were evaluated by haematoxylin and eosin (H&E) standard staining. Black arrows show the localization of tumor mass. Magnification of X20. (b) Graph shows the correlation of e5NT/CD73 activity and the tumor size *in vivo*. Data are means  $\pm$  SD of at least 4 animals per group or three independent experiments carried out in triplicates.

**Figure 5. Immunohistochemistry for nestin corroborates tumor absence in rats implanted with e5NT/CD73 KD cells.**

Glioma sections were incubated with nestin, a GBM marker. (a) Total number and the percentage of rats which developed tumors, detected through nestin stain. (b) Note the presence of a strong nestin positivity in the tumor area of C6 wt. A residual tumor in one C6-c54 implanted rat was observed as shown for the positive nestin reaction. Magnification of 20X (c) White arrows indicate a strong reaction in areas of peripheric pseudopalisading. Magnification of 200X.

**Figure 6. Co-implant of glioma cells with APCP, an e5NT/CD73 enzymatic inhibitor.**

Glioma cells were co-implanted with APCP (30  $\mu$ M) or DMSO (vehicle control) and tumor size was measured 20 d after tumor implantation as described in methods Data are means of three animals per group  $\pm$  SD.

Figure 1.

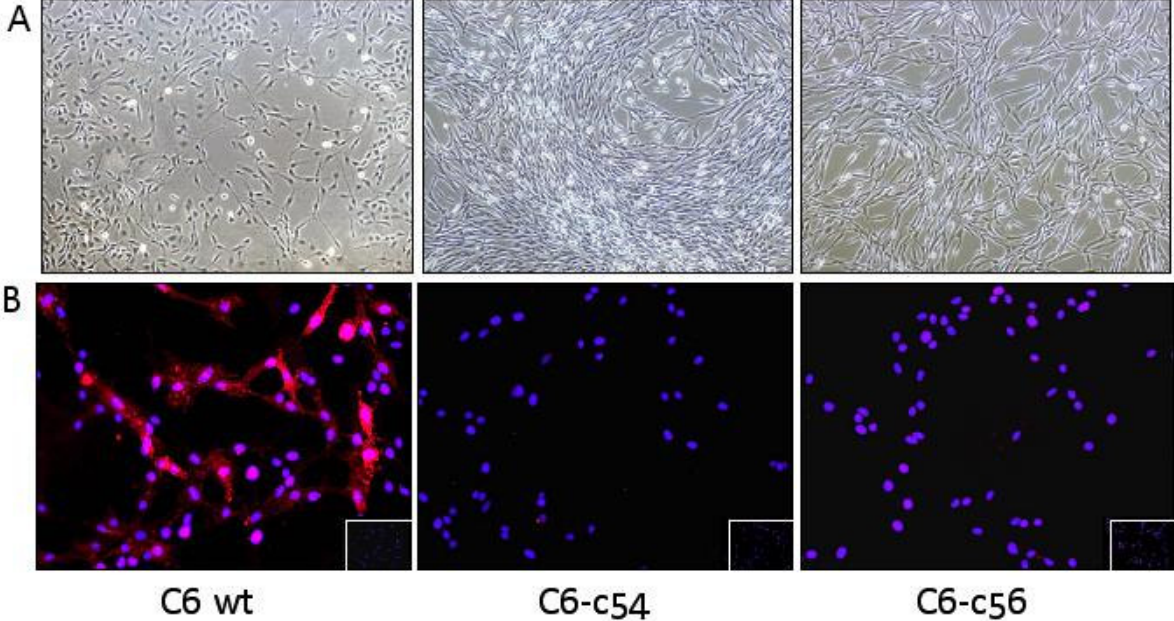


Figure 2.

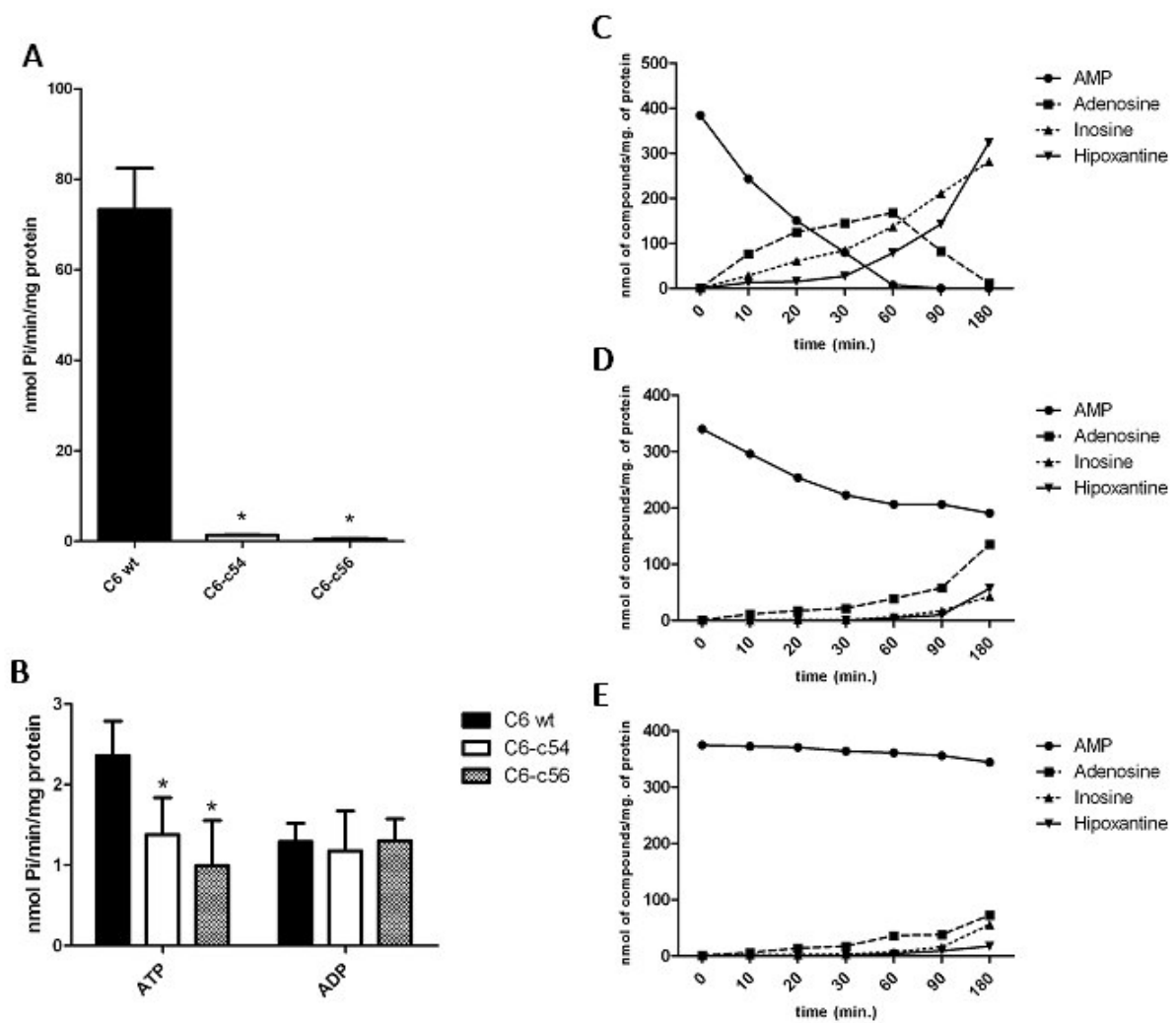


Figure 3.

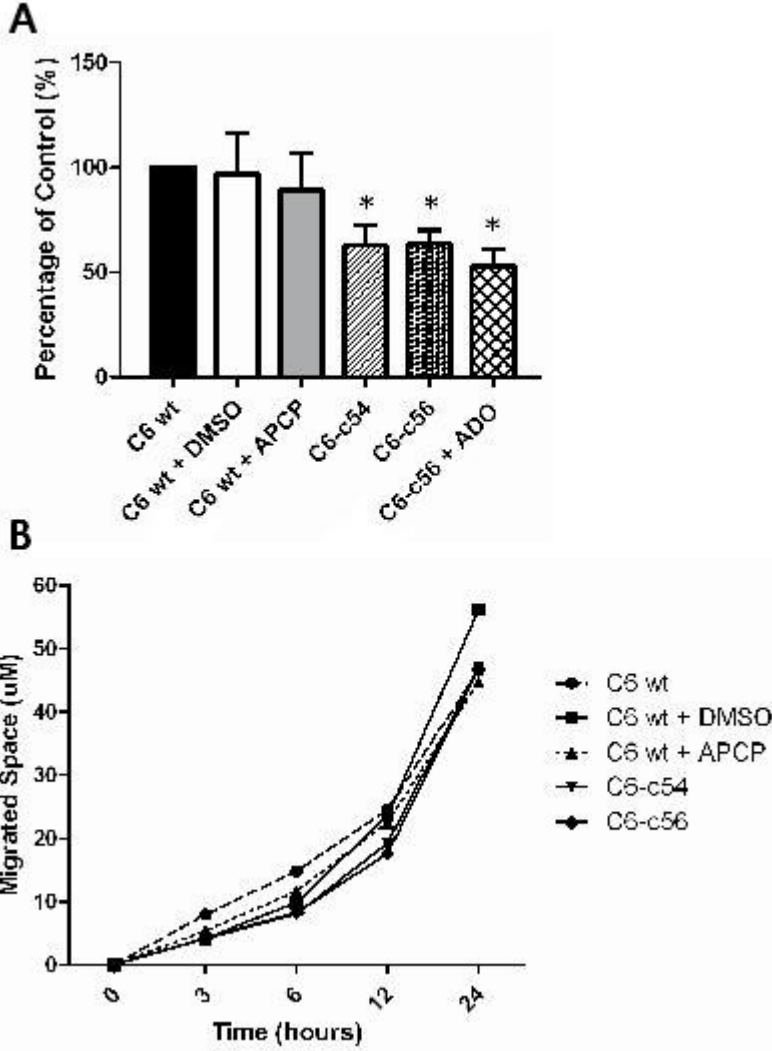


Figure 4.

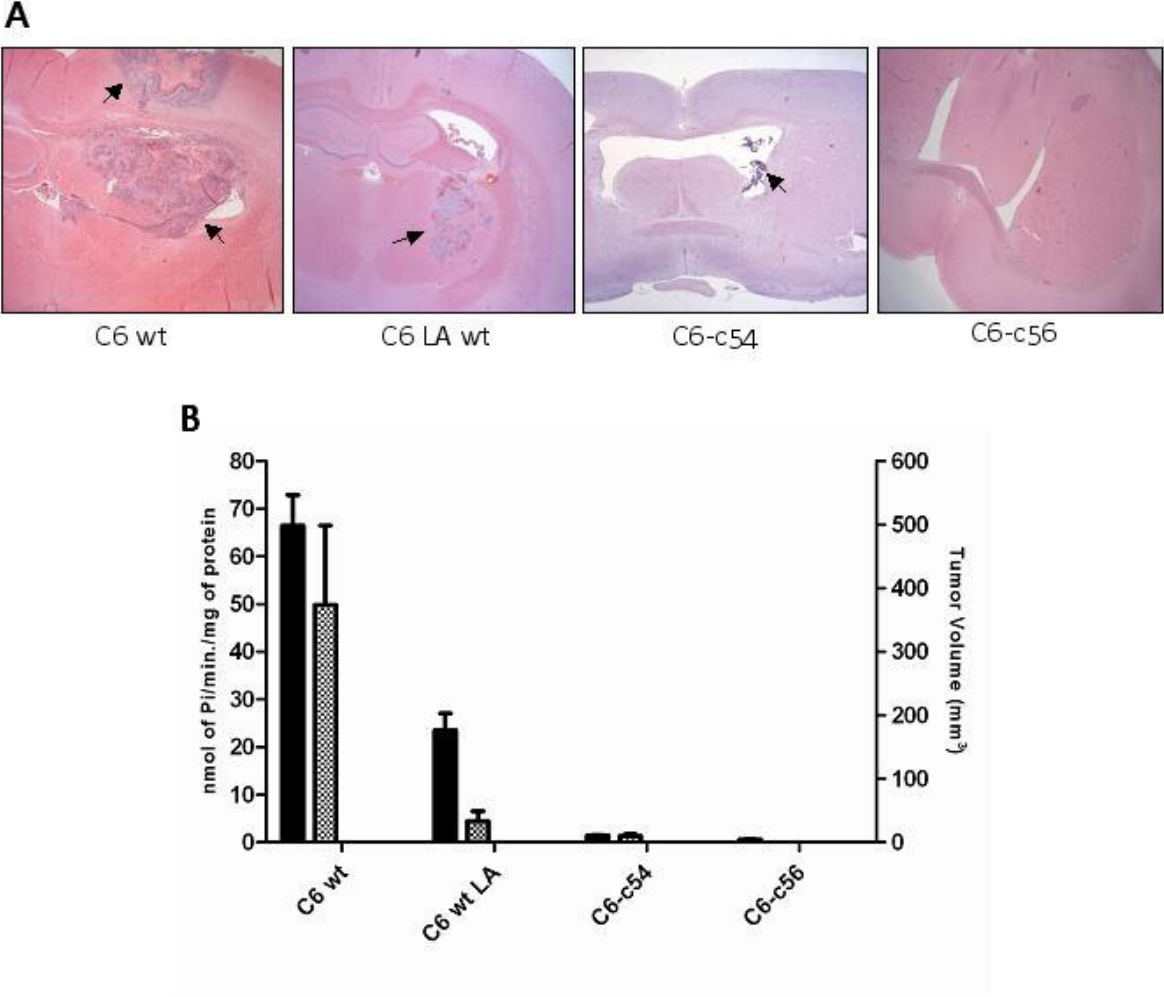


Figure 5.

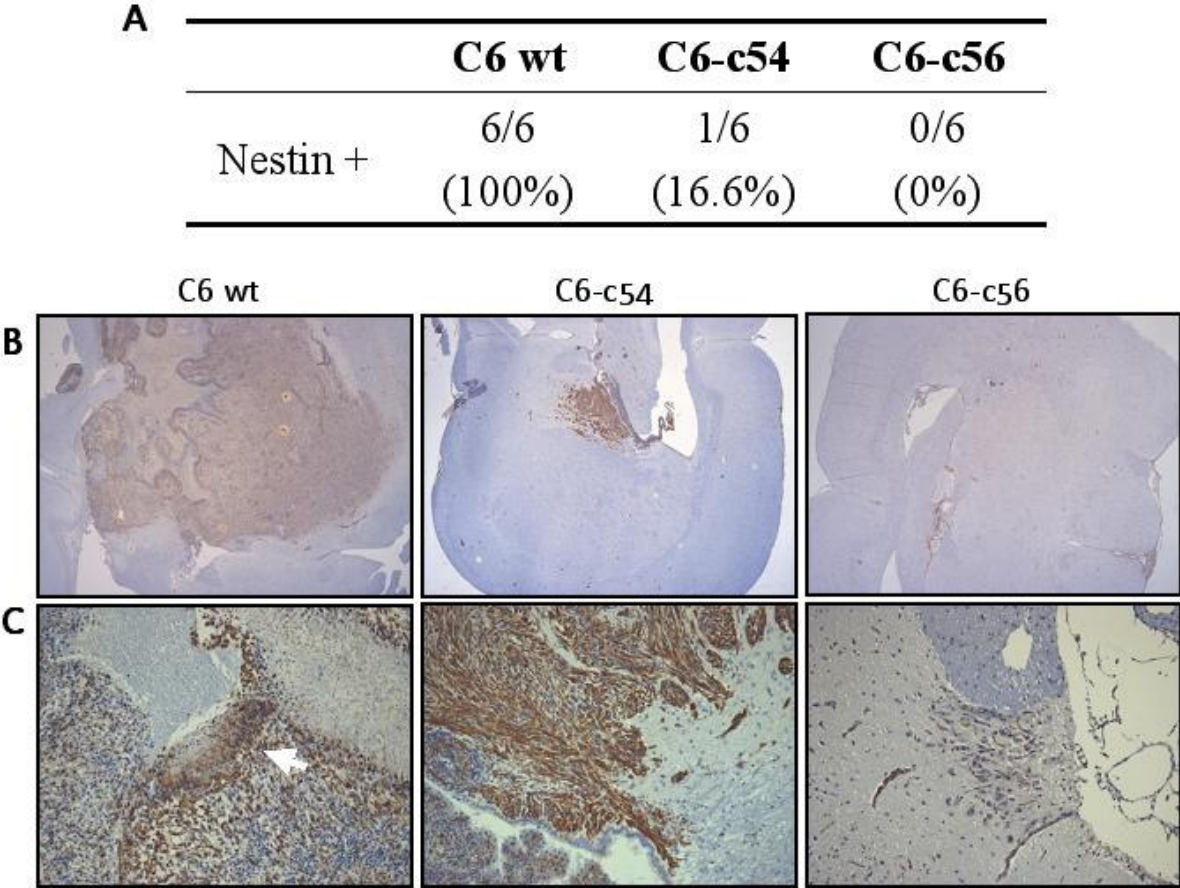
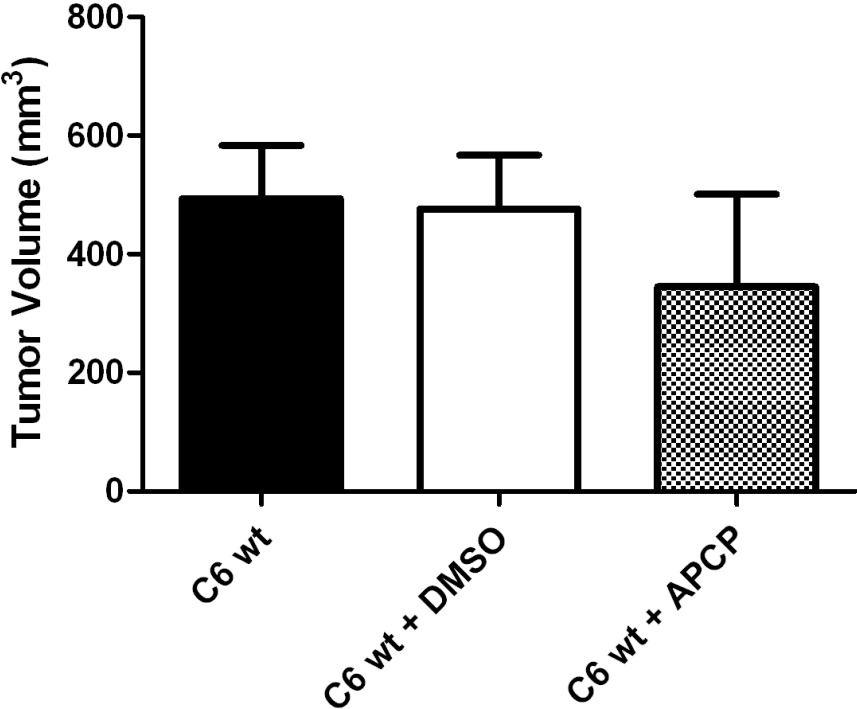




Figure 6.



#### 4. DISCUSSÃO

Glioblastomas (GBM) são uma classe de tumores que apresenta características bastante peculiares, o que os torna extremamente difíceis de serem tratados e, ainda mais, eliminados. Esses tumores apresentam um comportamento altamente proliferativo, com alta atividade angiogênica e, embora não façam metástase, têm a habilidade de infiltrar difusamente no parênquima cerebral (Holland, 2001; Morrone *et al*, 2006). Diversos tratamentos já foram sugeridos na literatura, no entanto, nenhum até o momento se mostrou eficiente no combate aos GBM.

No presente estudo, foi estudado o papel da e5NT/CD73, uma proteína com importantes funções fisiológicas e patológicas previamente descritas, como uma molécula crucial na progressão do GBM. A e5NT/CD73 foi descrita anteriormente como proteína com importante função pró-tumoral e altamente ativa em diferentes tumores, tais como carcinoma de mama, câncer gástrico, pancreático, leucemia mielóide crônica, linfoma de células T e em carcinoma Walker 256 (Spsychala, 2000). Além disso, a e5NT/CD73 foi mostrada estar altamente expressa nas agressivas formas de câncer, havendo uma maior atividade da enzima na transição do tumor no estado considerado “latente” para o estado altamente angiogênico e proliferativo (Almog *et al*, 2009; Johnston *et al*, 2007).

Todavia, poucos estudos se aprofundaram nas potenciais implicações da e5NT/CD73 na progressão dos GBM, e o esclarecimento do tema permite um

melhor entendimento da complexa biologia destes tumores e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

No presente estudo, silenciámos a expressão da enzima através de um sistema de transdução viral estável, o qual se mostrou extremamente efetivo nas nossas condições, já que a expressão da proteína bem como a atividade AMPásica foram praticamente nulas em ambos os clones de células de glioma de ratos C6 silenciados para e5NT/CD73.

Além disso, decidimos caracterizar o perfil de atividades ATPásica e ADPásica nas células silenciadas para e5NT/CD73. Como pode ser observado nos resultados, houve um decréscimo sutil mas significativo da atividade ATPásica em ambos clones c54 e c56. A co-expressão localizada de toda cascata das ectonucleotidases, incluindo a ecto-ATPase, ecto-ADPase e e5NT/CD73 foi descrita (Braun and Zimmermann, 1998), o que demonstra a necessidade de uma regulação fina e coordenada de toda a sequência de eventos que levam à completa hidrólise do ATP extracelular. Além disso, foi demonstrado que o AMP age como inibidor da proliferação de células da linhagem U138-MG, de glioma humano, agindo como uma molécula tóxica para essas células (Bavaresco *et al*, 2008), e também teve um efeito inibitório no crescimento de células de câncer de mama (Mazurek *et al*, 1997). Logo, uma diminuição na atividade ATPásica pode estar evitando o acúmulo de AMP extracelular nas células silenciadas para e5NT/CD73 e esse resultado pode provavelmente refletir algum mecanismo compensatório, já que há uma perda na habilidade de hidrólise do AMP extracelular por essas células. Deve-se, entretanto salientar que a atividade de hidrólise do ATP pelas células de glioma é extremamente baixa em comparação

com a atividade de hidrólise do AMP (Wink et al., 2003), portanto, uma diminuição adicional na hidrólise do ATP pelas células silenciadas para a e5NT/CD73 deve ser melhor investigada.

A mobilidade e adesão celular são componentes essenciais na progressão tumoral, invasão e metástase (Zhi *et al*, 2007; Wang *et al*, 2007). Por essa razão, como parte da caracterização das células silenciadas, nós decidimos investigar tais parâmetros de malignidade *in vitro*. A diminuição na adesão celular observada em ambos os clones silenciados se deve provavelmente à perda da e5NT/CD73, a qual é uma proteína de membrana com papel chave na adesão célula-célula e célula-matriz previamente descrito na literatura, bem como pela diminuição nos níveis de adenosina extracelular e de ativação de receptores P1. Células tumorais são circundadas por uma matriz extracelular (MEC) modificada, composta de uma malha complexa de colágenos, glicoproteínas fibrilares e proteoglicanos (Zhi *et al*, 2007). A MEC intercomunica-se com as células e modula suas funções de adesão, proliferação e diferenciação (Ioachim *et al*, 2002). Relatos prévios indicam que a e5NT/CD73 pode ligar-se a outras células e interagir com proteínas presentes na MEC (Zimmermann, 1992; Aires *et al*, 1997). A e5NT/CD73 purificada de moela de galinha foi demonstrada interagir especificamente com fibronectina e laminina, e ambas afetam a atividade da enzima purificada (Stochaj *et al*, 1989). Além disso, a e5NT/CD73 medeia a adesão do linfócito ao endotélio (Airas *et al*, 1995) e estudos com glioblastoma humano sugeriram que a e5NT/CD73 deve servir como uma molécula de adesão promovendo invasão tumoral (Fenoglio *et al*, 1997). Por outro lado, a adenosina extracelular também exerce papel importante na mobilidade e adesão celular. Agindo através de seu

receptor A1, foi demonstrado que a adenosina pode promover adesão de neutrófilos ao endotélio (Cronstein *et al*, 1992). Para melhor compreender o mecanismo responsável pela diminuição da adesão nas células silenciadas, nós utilizamos o APCP, um inibidor enzimático competitivo da e5NT/CD73, no entanto ele não foi capaz de alterar a adesão das células C6 wt. Não obstante, também decidimos tratar as células do clone c56 com adenosina com a intenção de devolver esse nucleosídeo às células durante o processo de adesão, entretanto, esse tratamento não foi efetivo para alcançar o nível de adesão apresentado pela C6 wt. Dessa forma, nós concluímos que a alteração observada no parâmetro de adesão é devida a perda da propriedade adesiva da proteína e5NT/CD73 *per se*, e não pela geração de adenosina.

Por outro lado, nossa avaliação do parâmetro de migração *in vitro* não mostrou nenhuma alteração significativa. Experimentos adicionais serão importantes para evidenciar o papel da e5NT/CD73 na migração de células de glioblastoma, já que o mesmo já foi previamente descrito em outras células tumorais (Wang *et al*, 2007; Zhou & Zhou, 2006; Sadej *et al*, 2006). Outro dado observado, a mudança morfológica das células silenciadas pode ser explicado tanto pela diminuição da capacidade adesiva apresentada por essas células quanto por um possível rearranjo do citoesqueleto, já que uma interação da e5NT/CD73 com filamentos de actina já foi mostrada (Vedeler *et al*, 1991).

Para uma investigação mais aprofundada do papel da e5NT/CD73 na progressão do GBM, utilizamos um modelo *in vivo*. O implante de células malignas no tecido cerebral em um modelo animal representa de forma mais fidedigna os mecanismos que ocorrem no crescimento de tumores em humanos e tem

vantagem sobre métodos de avaliação mais simplificados, como os experimentos em cultura, nos quais não há reações inflamatórias e vasculares presentes (Grobber *et al*, 2002). Assim, o implante de células de glioma C6 no cérebro de ratos mostrou que quando as células silenciadas para e5NT/CD73 foram implantadas não houve a formação de uma massa tumoral, enquanto que o implante das células C6 wt desenvolveu um tumor de dimensão e características histopatológicas de glioblastoma multiforme. A ausência de células tumorais no local do implante das células silenciadas, foi confirmada pela ausência de imunodeteção para nestina, um marcador de GBM. Conforme observado, o experimento com nestina mostrou que, com exceção de um tumor residual do clone c54, o implante com células silenciadas para e5NT/CD73 não gerou tumores. Ao utilizarmos células C6 wt com muitas passagens, as quais verificamos que possuíam atividade AMPásica consideravelmente menor que as C6 wt utilizadas como controle, demonstramos uma interessante correlação entre atividade de e5NT/CD73 e crescimento tumoral. Essas células com menor atividade geraram tumores menores e menos malignos. De acordo com nossa hipótese purinérgica, o ATP liberado de células mortas ou que estejam sofrendo estresse pode ser eficientemente ser hidrolisado a adenosina por células que expressam altos níveis da ecto-ATPase, tais como os astrócitos, e por ação da e5NT/CD73, altamente expressa pelas células de glioma (Wink *et al*, 2003). Essa sequência de eventos levaria a um acúmulo de adenosina ao redor do tumor. A adenosina extracelular acumulada no tecido tumoral exerceria um importante mecanismo de escape a resposta imune e indução de angiogênese (Ohta *et al*, 2006; Grant *et al*, 1999). Dentre diversos efeitos, a adenosina derivada do tumor é

capaz de inibir profundamente células T anti-tumorais através da ativação dos receptores A2a (Ohta *et al*, 2006). Também, a adenosina inibe as citocinas pró-inflamatórias IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-12, INF $\gamma$  e a síntese da proteína-1 $\alpha$  de macrófagos (Spychala, 2000; Hasko *et al*, 2009) e estimula a síntese da anti-inflamatória IL-10. Os macrófagos associados a tumores (MAT), os quais representam uma importante fração da massa tumoral, estão presentes frequentemente em um fenótipo anti-inflamatório e dessa forma conseguem auxiliar o crescimento tumoral através da produção de diversos fatores de crescimento e citocinas pró-angiogênicas (Komohara *et al*, 2008).

Considerando isso, hipotetizamos que as células de GBM silenciadas para e5NT/CD73 podem não estar sendo capazes de crescer devido aos baixos níveis da adenosina, a qual apresenta conhecidas funções pró-tumorais e é moduladora da resposta imune, além da ausência da proteína *per se*, já que ela foi previamente mostrada agir de forma importante na invasão e metástase tumoral. Para explorar essas questões, nós co-injetamos as células C6 wt com o inibidor enzimático APCP, a fim de avaliar se a diminuição da produção de adenosina poderia afetar o crescimento dos tumores. No entanto, nós não observamos nenhuma alteração após os vinte dias do implante dos GBM. É provável que o efeito inibidor do APCP na atividade da e5NT/CD73 no momento do implante do glioma não foi suficiente para impedir o crescimento do tumor, assim como ocorreu quando implantamos células que constitutivamente não produzem adenosina. Dessa forma, nossos resultados mostram evidências consistentes do papel desempenhado pela e5NT/CD73 na progressão de GBM, já que o

silenciamento da proteína reduziu significativamente a adesão *in vitro* e o crescimento tumoral *in vivo*. Nós propomos que a e5NT/CD73 derivada dos tumores pode constituir um excelente alvo, em combinação com outras estratégias terapêuticas, para diminuir o potencial maligno, reforçar a resposta imune anti-tumoral endógena e qualificar o combate ao GBM.



## 5. CONCLUSÕES

- 1) O silenciamento da e5NT/CD73 alterou a morfologia das células em cultura;
- 2) Os dois clones de células silenciadas apresentaram menor capacidade adesiva *in vitro* em relação à selvagem, e esse comportamento foi mostrado ser devido à ausência da proteína *per se* e não pela falta do produto adenosina;
- 3) O implante com as células de glioma silenciadas para e5NT/CD73 não foi capaz de gerar tumor no nosso modelo animal;
- 4) A atividade AMPásica da enzima foi mostrada estar diretamente relacionada com o tamanho dos tumores;
- 5) A diminuição dos níveis de adenosina, com conhecidas funções pró-tumorais, bem como a falta da proteína na sua função adesiva *per se*, são as prováveis razões da ausência de crescimento dos gliomas silenciados para e5NT/CD73;
- 6) Nossos resultados corroboram o importante papel da e5NT/CD73 na progressão tumoral, e sugerem a necessidade de mais estudos para o estabelecimento de novas e mais promissoras estratégias terapêuticas.

## 6. PERSPECTIVAS

- Uso de plasmídeos para a superexpressão e perda da atividade enzimática por sítio ativo mutado de e5NT/CD73 em linhagens de glioma;
- Avaliar outros parâmetros envolvidos com a malignidade tumoral, tais como ensaios de invasão e adesão com diferentes matrizes extracelulares;
- Investigar a expressão de outros genes importantes para o crescimento tumoral nas células silenciadas para e5NT/CD73;
- Uso do meio condicionado das células de glioma silenciadas para o estudo do perfil de ativação e a secreção de fatores de cultura de macrófagos.

## 8. REFERÊNCIAS

AIRAS L., HELLMAN J., SALMI M., BONO P., PUURUNEN T., SMITH DJ, JALKANEN S. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med.* Nov 1;182(5):1603-8, 1995.

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

ALMOG N., MA L., RAYCHOWDHURY R., SCHWAGER C., ERBER R., SHORT S., HLATKY L., VAJKOCZY P., HUBER P.E., FOLKMAN J., ABDOLLAHI A. Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. *Cancer Res.* Feb 1; 69(3):836-44, 2009.

ARGYRIOU A.A., KALOFONOS H.P. Molecularly targeted therapies for malignant gliomas. *Mol Med.* Mar-Apr;15(3-4):115-22, 2009.

BARDOT V., DUTRILLAUX A.M., DELATTRE J.Y., VEGA F., POISSON M., DUTRILLAUX B., LUCCIONI C. Purine and pyrimidine metabolism in human gliomas: relation to chromosomal aberrations. *Br J Cancer.* Aug;70(2):212-8, 1994.

BAVARESCO L., BERNARDI A., BRAGANHOL E., CAPPELLARI A.R., ROCKENBACH L., FARIAS P.F., WINK M.R., DELGADO-CAÑEDO A., BATTASTINI A.M. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem.* Dec;319(1-2):61-8, 2008.

BENDA P., LIGHTBODY J., SATO G., LEVINE L., SWEET W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science.* Jul 26; 161(839):370-1, 1968.

BRAUN N, ZIMMERMANN H. Association of ecto-5'-nucleotidase with specific cell types in the adult and developing rat olfactory organ. *J Comp Neurol.* Apr 20; 393(4):528-37, 1998.

BURNSTOCK G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci.* 27(3):166-176, 2006.

CRONSTEIN B.N., LEVIN R.I., PHILIPS M., HIRSCHHORN R., ABRAMSON S.B., WEISSMANN G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol.* Apr 1;148(7):2201-6, 1992.

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

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

DELL'ALBANI P. Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res.* Dec;33(12):2407-15, 2008.

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

FIELDS R.D., BURNSTOCK G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nature Neurosci.* 7:423-435, 2006.

GRANT M.B., TARNUZZER R.W., CABALLERO S., OZECK M.J., DAVIS M.I., SPOERRI P.E., FEOKTISTOV I., BIAGGIONI I., SHRYOCK J.C., BELARDINELLI L. Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. *Circ Res.* Oct 15;85(8):699-706, 1999.

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: 257-270, 2002.

GROSZER M., ERICKSON R., SCRIPTURE-ADAMS D.D., DOUGHERY J.D., BELLE J.L., ZACK J.A., GESCHWIND D.H., LIU X., WU H. PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> cell cycle entry. *PNAS.* 103(1):111-116, 2006.

HASKÓ G., CSÓKA B., NÉMETH Z.H., VIZI E.S., PACHER P. A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation. *Trends Immunol.* Jun;30(6):263-70, 2009.

HOLLAND E.C. Glioblastoma multiforme: the terminator. *PNAS.* Jun 6;97(12):6242-4, 2000.

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

IOACHIM E., CHARCHANTI A., BRIASOULIS E., KARAVASILIS V., TSANOU H., ARVANITIS D.L., AGNANTIS N.J., PAVLIDIS N. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer.* Dec; 38(18):2362-70, 2002.

JOHNSTON A.L., LUN X., RAHN J.J., LIACINI A., WANG L., HAMILTON M.G., PARNEY I.F., HEMPSTEAD B.L., ROBBINS S.M., FORSYTH P.A., SENGER D.L. The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol.* Aug; 5(8):e212, 2007.

KOMOHARA Y., OHNISHI K., KURATSU J., TAKEYA M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol.* Sep;216(1):15-24, 2008.

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

LUDWIG H.C., RAUSCH S., SCHALLOCK K., MARKAKIS E. Expression of CD 73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. *Anticancer Res.* May-Jun;19(3A):1747-52, 1999.

MAHER E.A., FURNARI F.B., BACHOO R.M., ROWITCH D.H., LOUIS D.N., CAVENEE W.K., DEPINHO R.A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* Jun 1;15(11):1311-33, 2001.

MAZUREK S., MICHEL A., EIGENBRODT E. Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. *J Biol Chem.* Feb 21;272(8):4941-52, 1997.

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

MORRONE F. B., OLIVEIRA D.L., GAMERMANN P., STELLA J, WOFCHUK S., WINK M.R., MEURER L., EDELWEISS M.I., LENZ G., BATTASTINI A.M. In vivo

glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer*. Sep 23;6:226, 2006.

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

NAKADA M., NAKADA S., DEMUTH T., TRAN N. L., HOELZINGER D.B., BERENS M.E. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci*. 64:458-478, 2007.

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

NOVAK I. ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News Physiol*. 18:12-17, 2003.

OHTA A., GORELIK E., PRASAD S.J., RONCHESE F., LUKASHEV D., WONG M.K., HUANG X., CALDWELL S., LIU K., SMITH P., CHEN J.F., JACKSON E.K., APASOV S., ABRAMS S., SITKOVSKY M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 29; 103(35):13132-7, 2006.



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

PREUSSER M., HABERLER C., HAINFELLNER J.A. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. *Wien Med Wochenschr* 156/11-12:332-337, 2006.

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

RESTA R., THOMPSON L.F. T cell signalling through CD73. *Cell Signal.* Feb;9(2):131-9, 1997.

ROBSON S.C., SÉVIGNY J., ZIMMERMANN H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* Jun;2(2):409-30, 2006.

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

SALA-NEWBY G.B., SKLADANOWSKI A.C., NEWBY A.C. The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I. *J Biol Chem.* Jun 18;274(25):17789-93, 1999.

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

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

SINGH S.K., HAWKINS C., CLARKE I.D., SQUIRE J.A., BAYANI J., HIDE T., HENKELMAN R.M., CUSIMANO M.D., DIRKS P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 423: 396–401, 2004.

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

SPYCHALA J., LAZAROWSKI E., OSTAPKOWICZ A., AYSCUE L.H., JIN A., MITCHELL B.S. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res.* Jan 15;10(2):708-17, 2004.

STOCHAJ U., DIECKHOFF J., MOLLENHAUER J., CRAMER M., MANNHERZ H.G. Evidence for the direct interaction of chicken gizzard 5'-nucleotidase with laminin and fibronectin. *Biochim Biophys Acta*. Sep 15;992(3):385-92, 1989.

SU A.I., WELSH J.B., SAPINOSO L.M., KERN S.G., DIMITROV P., LAPP H., SCHULTZ P.G., POWELL S.M., MOSKALUK C.A., FRIERSON H.F. JR, HAMPTON G.M. Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res*. Oct 15;61(20):7388-93, 2001.

SUNDERMAN F.W. The biochemistry of 5'-nucleotidase. *Annals of Clin Lab Sci*. 20(2): 123-139, 1990.

VEDELER A., PRYME I.F., HESKETH J.E. Insulin induces changes in the subcellular distribution of actin and 5'-nucleotidase. *Mol Cell Biochem*. Nov 13; 108(1):67-74, 1991.

WANG L., ZHOU X., ZHOU T., MA D., CHEN S., ZHI X., YIN L., SHAO Z., OU Z., ZHOU P. Ecto-5-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. Mar; 134(3):365-72, 2008.

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

WHITE N., BURNSTOCK G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* Apr;27(4):211-7, 2006.

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

YEGUTKIN G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochem Biophys Acta.* 22, 2008.

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

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

ZHOU T.T., ZHOU P. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase(CD73) in invasion and migration of human breast cancer cell lines. *Chin J Pathophysiol.* 22:360-364, 2006.

ZHOU X., ZHI X., ZHOU P., CHEN S., ZHAO F., SHAO Z., OU Z., YIN L. Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* Jun;17(6):1341-6, 2007.

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

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

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

ZIMMERMANN H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunym-Schmiedelbergs's Arch pharmacol.* 362:299-309, 2000.

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

## ANEXO 1.

### PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO

ZANIN R.F., **CAMPESATO L.F.**, BRAGANHOL E., SCHETINGER M.R., WYSE A.T., BATTASTINI A.M. Homocysteine decreases extracellular nucleotide hydrolysis in rat platelets. *Thromb Res.* Mar;125(3):e87-92, 2010.

BRAGANHOL E., ZANIN R.F., BERNARDI A., BERGAMIN L.S., CAPPELLARI A.R., **CAMPESATO L.F.**, MORRONE F.B., CAMPOS M.M., CALIXTO J.B., EDELWEISS M., WINK M.R., ROBSON S.C. BATTASTINI A.M. Selective NTPDase2 overexpression in gliomas drives inflammation, platelet activation and metastasis. Artigo a ser submetido à revista Cancer Science.

## ANEXO 2.



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 08-578

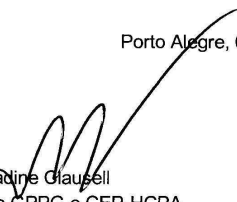
**Pesquisadores:**

MARIA ISABEL ALBANO EDELWEISS  
ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI  
GUIDO LENZ  
ANDRESSA BERNARDI  
PATRICIA LUCIANA DA COSTA LOPEZ  
LUIZ FELIPE INGRASSIA CAMPESATO  
ALESSANDRA S. K. TAMAJUSUKU

**Título:** EFEITO DO SILENCIAMENTO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 NA  
PROLIFERAÇÃO DE GLIOMAS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 02 de dezembro de 2008.

  
Profª Márcia Clausell  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

## ANEXO 3.

### Preparing main manuscript text

Manuscripts for Research articles submitted to *BMC Cancer* should be divided into the following sections:

#### Title page

This should list the title of the article. The title should include the study design, for example:

**A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial**

**X is a risk factor for Y: a case control study**

The full names, institutional addresses, and e-mail addresses for all authors must be included on the title page. The corresponding author should also be indicated.

#### Abstract

The abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract; **Trial registration**, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number, e.g. **Trial registration**: Current Controlled Trials ISRCTN73824458. Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number.

#### Background

The background section should be written from the standpoint of researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a very brief statement of what is being reported in the article.

#### Methods

This should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate.



## **Results and Discussion**

The Results and Discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

## **Conclusions**

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

## **List of abbreviations**

If abbreviations are used in the text, either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

## **Competing interests**

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors should disclose any financial competing interests but also any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

### *Financial competing interests*

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees,

funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.

- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

#### *Non-financial competing interests*

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you or one of your co-authors has a competing interest, please discuss it with the editorial office.

#### **Authors' contributions**

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An "author" is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

#### **Authors' information**

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

## **Acknowledgements**

Please acknowledge anyone who contributed towards the study by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include their source(s) of funding. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study.

The role of a medical writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements.

Please list the source(s) of funding for the study, for each author, and for the manuscript preparation in the acknowledgements section. Authors must describe the role of the funding body, if any, in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

## **References**

All references must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Reference citations should not appear in titles or headings. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished data", "unpublished observations", or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Notes/footnotes are not allowed. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited author(s) is the responsibility of the author. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should contain all named authors, regardless of how many there are.

Examples of the *BMC Cancer* reference style are shown below. Please take care to follow the reference style precisely; references not in the correct style may be retyped, necessitating tedious proofreading.

*BMC Cancer* reference style

*Article within a journal*

1. Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

*Article within a journal supplement*

2. Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

*In press article*

3. Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

*Published abstract*

4. Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

*Article within conference proceedings*

5. Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore.* Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

*Book chapter, or article within a book*

6. Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2.* 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

*Whole issue of journal*

7. Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

*Whole conference proceedings*

8. Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore.* Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

*Complete book*

9. Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells.* New Haven: Yale University Press; 1970.

*Monograph or book in a series*

10. Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage.** In *Cultured Human Cells and Tissues.* Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

*Book with institutional author*

11. Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report.* London; 1999.

*PhD thesis*

12. Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

*Link / URL*

13. **The Mouse Tumor Biology Database**

[<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

## **Preparing illustrations and figures**

Figures should be provided as separate files. Each figure should comprise only a single file. There is no charge for the use of color.

Formats

The following file formats can be accepted:

- **EPS** (preferred format for diagrams)
- **PDF** (also especially suitable for diagrams)
- **PNG** (preferred format for photos or images)
- Microsoft Word (figures must be a single page)
- PowerPoint (figures must be a single page)
- TIFF
- JPEG
- BMP
- CDX (ChemDraw)
- TGF (ISIS/Draw)

Figure

legends

The legends should be included in the main manuscript text file immediately following the references, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

**Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder** to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

## **Preparing tables**

Each table should be numbered in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title that summarizes the whole table, maximum 15 words. Detailed legends may then follow, but should be concise.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in portrait format (note that tables on a landscape

page must be reformatted onto a portrait page or submitted as additional files). These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading should not be used.

Larger datasets can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, published form of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.