

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

**EFEITO DE DIFERENTES COMPONENTES DA MATRIZ
EXTRACELULAR SOBRE A ECTO-5'-NUCLEOTIDASE,
PROLIFERAÇÃO, ADESÃO E MIGRAÇÃO CELULAR NA
LINHAGEM DE CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO U138-MG**

ANGÉLICA REGINA CAPPELLARI

Orientadora

Dra. Ana Maria Oliveira Battastini

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

Porto Alegre

2008

***A todos aqueles que acreditam que
através da educação poderemos construir um mundo melhor.***

**“O começo da sabedoria é encontrado
na dúvida; duvidando começamos
a questionar, e procurando podemos
achar a verdade.” (Pierre Abelard)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter concedido a mim a graça de alcançar meus objetivos, por ter me dado saúde, força e coragem para chegar até aqui.

Aqui, quero agradecer a aqueles que foram indispensáveis para que esse trabalho pudesse ser concluído.

Primeiramente agradeço à minha mãe, pela mulher esplendorosa que ela é, pelo exemplo de vida que ela representa para mim. Agradeço a ti minha amada mãe pela educação que me destes, por mostrar a mim valores indispensáveis, por me ensinar a ser uma guerreira e por lutar por meus ideais, por me mostrar que as lágrimas derramadas não são de sofrimento e sim de aprendizado. Obrigada por me ligar sempre quando eu queria e precisava de suas palavras de conforto, se fazendo presente em todos os momentos passando por cima desta barreira que se interpõe entre nós, a distância. Obrigada por ser a minha mãe.

Ao meu pai pelo apoio e incentivo, pelo amor e carinho demonstrado.

A Alana, minha maninha, que me ensina a ser criança e dar valor aos pequenos momentos da vida, encontrando neles a suprema alegria. Agradeço também aos meus irmãos Alessandra e Eduardo.

Agradeço a Ana, por ter me aceitado sem ao menos me conhecer. Por ter depositado em mim sua confiança, pelo exemplo de uma excelente profissional que leva a sério o que faz e pela competência com que exerce sua profissão. Obrigada pela amizade e incentivo. Posso certamente afirmar que tu exerce para com seus orientandos o papel de “Mãe científica”.

Agradeço muito ao apoio, carinho, confiança e amizade que o Senhor José, a Marlene e o Marcelo tiveram comigo desde o primeiro dia que cheguei em Porto Alegre. Obrigada por terem me acolhido e me fazerem sentir parte de sua família.

À Gabriela e a Liliana, por serem minhas irmãzinhas aqui, minhas companheirinhas de sempre. Obrigada pelo carinho e afeto demonstrado. Vocês são muito especiais.

À Elizandra Braganhol, que também faz parte da minha família de Porto Alegre. Pela paciência ao ensinar as técnicas do laboratório e sentar comigo sempre que precisava sanar minhas dúvidas. Pela maravilhosa amiga que tu és.

Aos demais amigos do laboratório 22. Daia, Fabrícia, Fabrício, Luci, Letícia, Andressa, Rudi, Rafael, Luiz Felipe, Vanessa, Belinha, companhias que tornam nossos longos dias no laboratório mais alegres. Agradeço também a todos do lab 24.

Ao Departamento de Bioquímica, aos professores e funcionários que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a Cléia e a Simone, pela dedicação e paciência com as nossas documentações. Também a Dona Lia e a Lucimara, pelo apoio com nossos materiais de pesquisa pois sem elas, tudo vai mais devagar.

À Professora Carmem Gottfried, pela importante colaboração na fase inicial deste trabalho.

À Professora Carla Dalmaz, pelos ensinamentos e paciência em me auxiliar com as estatísticas de meu trabalho.

Agradeço ao Claudius. A conclusão deste trabalho também pertence a ti. Obrigado pelo companheirismo, pelo carinho, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis que passei e também os mais alegres. Tu és uma pessoa maravilhosa. Tu és o meu amor!

RESUMO

Glioblastoma multiforme é a forma mais comum e agressiva de tumor cerebral que apresenta um severo crescimento e um comportamento altamente invasivo. Linhagens de células de glioma em cultura apresentam alta atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase que metaboliza AMP em adenosina. Em adição, ela também interage com componentes da matriz extracelular como molécula adesiva. Neste trabalho, nós avaliamos o efeito de diferentes componentes da matriz extracelular sobre a atividade da ecto-5'-nucleotidase, proliferação, adesão e migração celular na linhagem de células de glioma humano U138-MG. Os resultados obtidos mostraram uma inibição da atividade enzimática da ecto-5'-nucleotidase quando tratada com laminina sozinha e com fibronectina ou laminina em co-tratamento com dextran sulfato. O dextran sulfato mostrou reduzir a proliferação em 37%. O mesmo efeito foi observado para os co-tratamentos entre dextran/laminina (29%) e dextran/colágeno (28%). A presença de adenosina diminuiu a adesão celular em torno de 40% e o APCP aumentou a adesão em 75%. Laminina inibiu a adesão celular, já a condroitina sulfato aumentou em 70%. As células U138 apresentaram uma redução da adesão e migração celular quando tratadas apenas com dextran e também no co-tratamento deste com adenosina e APCP. Diante dos resultados podemos sugerir a modulação da atividade da ecto-5'-nucleotidase e assim uma modulação da produção de adenosina por moléculas da matriz extracelular, afetando assim eventos celulares envolvidos no comportamento invasivo destas células tumorais.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme is the most aggressive form of brain tumor that shows a severe growth and highly invasiveness behavior. Glioma cell lines in culture present a high activity of the ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT/CD73) which metabolizes AMP to adenosine. In addition, ecto-5'-NT/CD73 also has contact with extracellular matrix components like adhesive molecule. In the present paper, we evaluate the effect of distinct extracellular matrix components on the ecto-5'-NT/CD73 activity, proliferation, adhesion and migration in U138-MG human glioma cell line. The results showed an inhibition of enzymatic activity of ecto-5'-NT/CD73 in the presence of laminin, fibronectin plus dextran sulfate and laminin plus dextran sulfate. In the proliferation assay it was observed that dextran sulfate reduced the proliferation in 37% and in association with collagen type I or laminin, the proliferation was reduced too (28% and 29%, respectively). The presence of adenosina decreased of adhesion at about 40% and when treated with APCP increased in 75%. Laminin inhibited the cell adhesion and chondroitin sulfate increased in 70%. U138 cells presented reduction of adhesion and cell migration in the presence of dextran sulfate alone and in the presence of adenosine and APCP. Taken together these results suggest the modulation of ecto-5'-NT/CD73 activity and production of adenosin by extracellular matrix molecules, affecting cell events involved in the invasiveness behavior this tumor cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	XI
1.1 Os gliomas.....	XI
1.1.1 Generalidades.....	XI
Sobrevida.....	XII
1.1.2 Classificação.....	XIII
1.1.3 Alterações Gênicas.....	XIV
1.1.4 Histogênese.....	XVII
1.1.5 Invasibilidade.....	XVIII
1.2 Matriz Extracelular do Sistema nervoso Central e dos Gliomas.....	XXI
1.3 Sistema Purinérgico.....	XXII
1.3.1 Receptores purinérgicos.....	XXIII
1.3.2 A família das ectonucleotidasas.....	XXV
1.3.3 Ecto-5'-nucleotidase e adenosina.....	XXVIII
1.4 Relação entre gliomas, ecto-5'-nucleotidase e matriz extracelular.....	XXX
2. OBJETIVOS.....	XXXII
3. RESULTADOS.....	XXXIII
3.1 Effect of extracellular matrix components on ecto-5'-nucleotidase activity, proliferation, adhesion and cellular migration of U138-MG human glioma cell line	XXXIII
Abstract.....	XXXVII
4. DISCUSSÃO.....	LXVI
5. CONCLUSÕES.....	LXXIII
6. PERSPECTIVAS.....	LXXIV
7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO.....	LXXV
8. REFERÊNCIAS.....	LXXVI

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACRs** – regiões conservadas da apirase
- ADO** - adenosina
- ADP** - adenosina difosfato
- AMP** - adenosina monofosfato
- AMP** - adenosina monofosfato cíclico
- APCP** - α,β -metileno ADP
- ATP** - adenosina trifosfato
- Ecto-5'-NT/ CD73** - ecto 5'-nucleotidase/CD73
- EGFR** - receptor do fator de crescimento epidermal
- E-NPP** - ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
- E-NTPDase** - ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolase
- FGF** – fator de crescimento fibroblástico
- GABA** – ácido gama-aminobutírico
- GBM** - glioblastoma multiforme
- GPI** - glicosil-fosfatidilinositol
- ICAM** – molécula de adesão intercelular
- IRM** – imagem de ressonância magnética
- MAPK** - proteína cinase ativada por mitógenos
- MEC** - matriz extracelular
- NCAM** – molécula de adesão a célula neural
- NGF** – fator de crescimento neuronal
- OMS** - Organização Mundial da Saúde
- P1** - receptor purinérgico metabotrópico para adenosina
- P2X** - receptor purinérgico ionotrópico

P2Y - receptor purinérgico metabotrópico

p53 - gene supressor tumoral

PIP3 – fosfatidil inositol 3-fosfato

PKA – proteína cinase A

PKC - proteína cinase C

PTEN - proteína fosfatase homóloga da tensina

SNC - sistema nervoso central

VCAM – molécula de adesão vascular

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os gliomas

1.1.1 Generalidades

Gliomas são a forma mais comum e maligna de tumores primários cerebrais em adultos, contabilizando cerca de 78% de todos os tumores malignos primários intrínsecos do Sistema Nervoso Central (SNC), e ainda, apresentam uma alta taxa de mortalidade (Sathornsumetee et al, 2007). Existem aproximadamente 25000 novos casos diagnosticados por ano na América e apesar disso, a biologia destes tumores é ainda pobremente compreendida (He & Sun, 2007).

Os tumores cerebrais malignos podem se manifestar em diferentes idades, incluindo casos congênitos e em crianças. A maior incidência é, contudo, em adultos com idade acima dos 40 anos, sendo que, homens são mais freqüentemente afetados do que mulheres (Preusser et al, 2006). A média de sobrevida dos pacientes, após a ressecção cirúrgica, varia de acordo com o grau do tumor identificado, onde quanto maior o grau tumoral, menor o tempo de vida (Tabela 1).

A sintomatologia relacionada a esta neoplasia pode causar tanto sintomas neurológicos locais como generalizados. Os sintomas generalizados refletem um aumento na pressão intracranial e resultam em fortes dores de cabeça. Quando a doença atinge um estágio mais avançado surge náusea, vômito e anormalidades visuais. Sinais e/ou sintomas focalizados, tais como hemiparesia e afasia,

refletem a localização intracranial do tumor. A frequência e duração dos sintomas variam com o tipo de tumor (Tabela 2) (De Angelis, 2001).

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

Tabela 1: Relação entre grau tumoral, tempo de sobrevivência média e características histológicas. Adaptado de Maher et al. (2001).

O único teste necessário para diagnosticar o tumor cerebral é a imagem de ressonância magnética cranial (IRM), (De Angelis, 2001). A terapêutica usual padrão para o tratamento de indivíduos com tumor cerebral, inclui, na maioria dos casos, cirurgia, radio e quimioterapia. Recentes descobertas relacionadas a modificações moleculares na patogênese dos gliomas tem levado a uma inovação desta terapêutica, a qual inclui terapia de alvos moleculares, imunoterapia e terapia gênica. Em adição a estas, tem surgido novas estratégias para aumentar a entrega de agentes terapêuticos no SNC, que inclui a administração local de polímeros, aumento da velocidade de liberação do fármaco e ainda outros novos sistemas, como, por exemplo, as nanopartículas que podem elevar a eficiência terapêutica (Sathornsumetee et al, 2007)

Sintomas	Tipo de Tumor			
	Glioma de baixo grau	Glioma maligno	Meningioma	Linfoma primário do SNC

	Percentual que apresenta o tumor			
	40	50	36	35
Dores de cabeça	40	50	36	35
Convulsões	65-95	15-25	40	17
Hemiparalisia	5-15	30-50	22	24
Anormalidades	10	40-60	21	61
no estado mental				

Tabela 2: Variação da freqüência dos diferentes sintomas de acordo com cada grau tumoral. Adaptado de DeAngelis (2001).

1.1.2 Classificação

A Organização Mundial da Saúde (OMS), apresenta o esquema de classificação e graduação dos tumores do Sistema Nervoso Central mais utilizado na identificação de tal patologia. Os gliomas são classificados de acordo com a tipo celular que hipoteticamente lhe deu origem e são graduados em uma escala de I a IV, de acordo com o grau de malignidade apresentado (Maher et al., 2001). São levadas em consideração marcadas aberrações histológicas tais como núcleo atípico, elevada atividade mitótica, hiperplasia endotelial e necrose (Nakada et al, 2007), além de avaliar características invasivas, adesivas e migratórias (Chintala, 1999). De acordo com tal graduação, os astrocitomas pilocíticos, que correspondem ao grau I, são tumores relativamente benignos e que, geralmente, ocorrem entre crianças e adultos jovens (Duarte et al, 1994) e ainda apresentam uma limitada capacidade invasiva e raramente suportam progressão anaplásica. Além disso, apresentam hiperplasia microvascular e pleomorfismo celular, apesar de sua designação de grau I (Sanai et al, 2005). Astrocitoma difuso e xantocitoma pleomórfico (grau II), apresentam pleomorfismo celular distinto e visível, no entanto, possuem capacidade invasiva limitada, infiltrando-se difusamente pelo parênquima cerebral e ao redor do tumor.

Possuem alta frequência de progressão anaplásica (Girolami et al, 2000; Sanai et al, 2005). O astrocitoma de grau III tem uma alta taxa de proliferação celular, um moderado grau de pleomorfismo celular e uma celularidade heterogênea. São caracterizados por astrócitos fibrilares ou gemistocíticos, com rápida progressão para um grau tumoral mais maligno. Glioblastoma multiforme – GBM (grau IV) é o tumor glial mais agressivo e comumente encontrado na região frontotemporal, podendo também afetar os lobos parietais. Apresenta características distintivas com necrose geográfica ou em pseudopaliçada, hiperplasia microvascular visível em adição ao marcado pleomorfismo celular (Daí e Holand, 2001; Sanai et al, 2005).

Os glioblastomas podem surgir a partir de duas vias distintas de progressão neoplásica. Gliomas que progridem de tumores astrocíticos de baixo grau (II ou III) são chamados de secundários ou GBM do tipo I, tipicamente apresentando ambos os focos, bem e pouco diferenciados. São identificados normalmente em pacientes com idade entre 50 e 60 anos. Em contraste, os Glioblastomas primários, ou GBM do tipo II, desenvolvem-se em indivíduos com idade acima dos 60 anos, com uma história clínica curta, cerca de 3 meses, e surgem “de novo” sem nenhuma evidência de um precursor de baixo grau (Miller e Perry, 2007).

1.1.3 Alterações Gênicas

Mudanças na morfologia observadas durante o processo de transformação maligna, refletem a aquisição seqüencial de alterações gênicas. Muito dos genes

envolvidos nestas mudanças tem sido identificados e a correlação entre características clínicas, histopatológicas e genéticas tem levado a identificação de distintas vias moleculares, conduzindo o glioblastoma como o comum e mais maligno ponto final (Kleihues e Ohgaki, 1999). As alterações genéticas estão associadas com a desorganização da regulação da proliferação celular, apoptose, senescência, migração e comunicação célula a célula (Preusser et al., 2006). A frequência de tais distúrbios está presente nos glioblastomas primários e secundários de uma forma diferenciada (Franco-Hernandez et al, 2007). Dentre as inúmeras deformidades genéticas, as que mais se destacam são as mutações do gene p53 e sua proteína, as alterações no cromossomo 10 (PTEN – proteína fosfatase homóloga da tensina), perda da heterozigotidade e a amplificação do EGFR (receptor para fator de crescimento epidermal) (Figura 1).

Mutações no gene p53 estão entre as primeiras alterações genéticas identificadas nos tumores cerebrais astrocíticos (Kleihues e Ohgaki, 1999), sendo que este gene é conhecido como supressor tumoral, pois codifica uma proteína que se liga a seqüências específicas do DNA, ativando assim a transcrição de genes alvo. Perda nas funções desta proteína levam a um crescimento descontrolado, instabilidade genômica e imortalização das células, caracterizando a transformação neoplásica (Nozaki et al, 1999). Deformidades no gene p53 e o acúmulo da proteína por ele codificada (P53) são pobremente identificados em glioblastomas primários e, contraditoriamente, são fortemente encontradas em tumores de baixo grau (II e III) e também em glioblastomas secundários (Kleihues e Ohgaki, 1999).

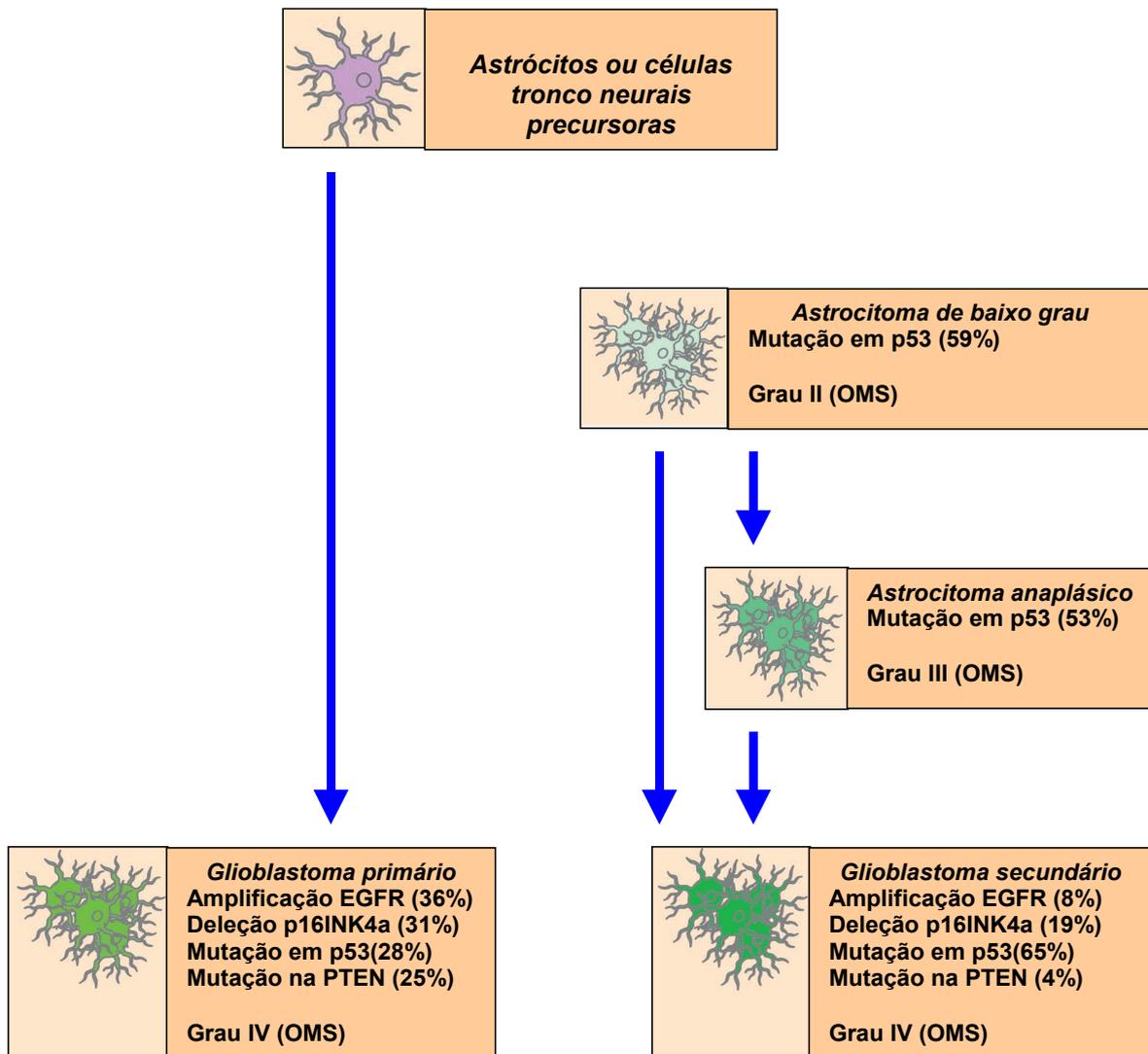


Figura 1: Padrão de distribuição das principais alterações genéticas de acordo com a origem e grau tumoral. Adaptado a partir de Ohgaki e Kleihues (2007).

A PTEN tem seu gene localizado no cromossomo 10, sendo também um gene de supressão tumoral, o qual foi o primeiro a ser identificado por estar frequentemente mutado ou deletado somaticamente em vários cânceres humanos, incluindo o glioblastoma multiforme. A deficiência na PTEN, leva ao acúmulo de 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).

EGFR, está envolvido no controle da proliferação celular e apresenta-se amplificado e superexpresso em mais de 1/3 dos casos de glioblastoma, com uma forma truncada e rearranjada. Este mutante EGFR confere aumentada tumorigenicidade, em células de glioblastoma humano, por elevar a taxa de proliferação e reduzir a apoptose. Gliomas com distúrbios no EGFR, tipicamente apresentam alterações relacionadas à PTEN (Kleihues e Ohgaki, 1999).

Em contraste, as mutações na p53, a amplificação do EGFR e as alterações na PTEN, mostram associações inversas, uma em relação à outra. Na via de formação do glioblastoma secundário, as mutações em p53 ocorrem precocemente e as demais mutações constituem eventos mais tardios. Contudo, a seqüência de alterações genéticas que levam a formação do glioblastoma primário é pouco conhecida (Ohgaki e Kleihues, 2007).

1.1.4 Histogênese

A célula de origem do glioblastoma tem sido determinada a longo tempo como sendo o astrócito, devido a algumas similaridades morfológicas e moleculares e ainda, pelo fato de o astrócito ser um tipo de célula capaz de se proliferar no cérebro maduro (Quigley et al, 2007). No entanto, esta hipótese não é bem aceita devido à dificuldade de explicar adequadamente a origem de alguns gliomas, como os mistos (oligoastrocitomas), que apresentam características de astrócitos e oligodendrócitos (Sanai et al, 2005).

Hoje se sabe da existência de populações de células indiferenciadas, localizadas no cérebro adulto, que apresentam propriedades proliferativas e de diferenciação. Estas são conhecidas como células tronco neurais e células progenitoras gliais. Estes tipos celulares apresentam inúmeras características e comportamentos que também se fazem presentes em células de glioma e ainda estão localizadas, principalmente, na zona subventricular, região esta de maior incidência dos tumores cerebrais (Sanai et al, 2005). Inúmeros marcadores de células indiferenciadas, como a presença das proteínas CD133 e nestina, dentre outros, são também expressos por células carcinogênicas do SNC. Experimentos realizados com células isoladas de glioblastoma CD133⁺, obtidas de pacientes, desenvolveram tumores xenográficos em cobaias, com características idênticas aos gliomas humanos, permitindo sugerir que, células com estas características, podem ser responsáveis pelo surgimento e/ou desenvolvimento dos tumores cerebrais malignos (Singh et al, 2004), (Figura 2). Contudo, o passo inicial que leva tais células à progressão maligna, não é conhecido.

1.1.5 Invasibilidade

Uma das características dos glioblastomas é sua habilidade em infiltrar-se e invadir o tecido normal circundante (Nakada et al., 2006). Tumores cerebrais de alto grau apresentam uma média de sobrevida muito baixa e a primeira razão para este triste prognóstico é a invasão difusa de uma única célula tumorigênica, que pode migrar de 4,0 a 7,0 cm a partir do glioma em direção ao tecido cerebral sadio. Supõe-se que estas células sejam as responsáveis pela alta taxa de recorrências dos gliomas e a rápida disseminação do tumor (Goldbruner et al.,

1999). Estas células apresentam uma tendência infiltrativa com preferência a locais específicos do SNC sendo ao longo da parede periférica dos vasos sanguíneos, na extensão do espaço glial subpial (glia limitante externa) ou através dos tratos de medula branca, tal como o corpo caloso (Bellail et al., 2004). Os mecanismos moleculares básicos do tumor cerebral envolvem um integrado processo bioquímico, coordenado entre interações intra e extracelulares (Figura3) (Nakada et al., 2006).

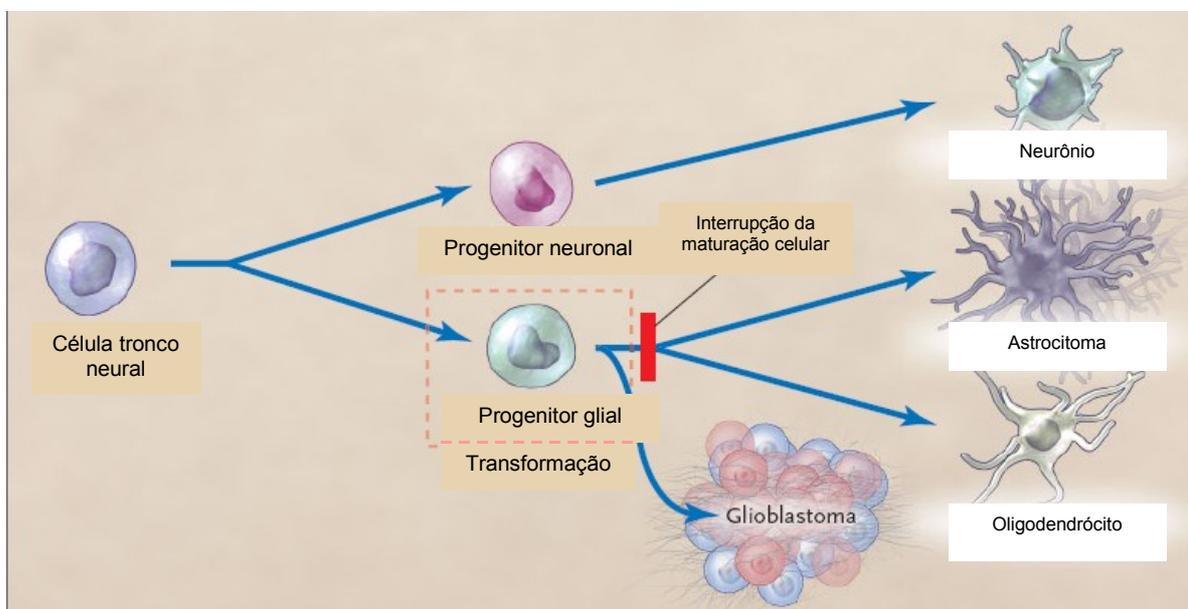


Figura 2: Esquema representativo da formação de um glioblastoma a partir de uma célula tronco neural e/ou célula progenitora glial. Adaptado de Sanai et al. (2005).

Existem muitos receptores de superfície celular envolvidos na adesão, migração e invasão celular. As integrinas como moléculas de adesão e a CD44 como receptor de hialuronato, apresentam o principal papel na adesão da célula do glioma à matriz. Na interação célula a célula, são destacadas as caderinas e as selectinas, em particular, os membros da superfamília das imunoglobulinas

como a molécula de adesão a célula neural (NCAM), a molécula de adesão intercelular (ICAM) e a molécula de adesão celular vascular (VCAM) (Goldbrunner et al., 1999).

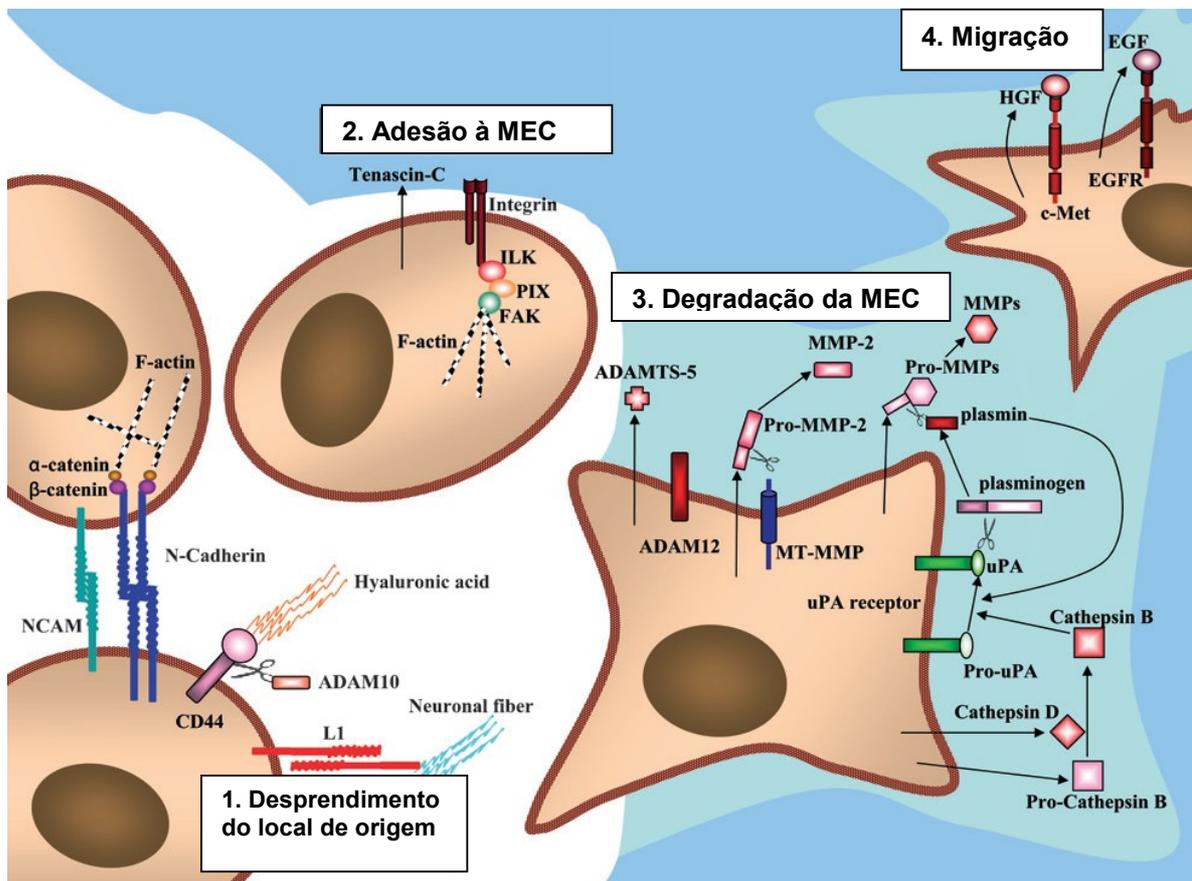


Figura 3: Mecanismo de invasibilidade das células tumorais. A atividade invasiva inicial requer o desprendimento da célula de seu local original. Subseqüentemente, a célula tumoral irá se aderir às proteínas da matriz extracelular, via receptores e em seguida, irá degradar essas proteínas via ação de proteases específicas. Esta ação sinaliza inúmeras alterações morfológicas na célula, envolvidas no último passo da invasão, a migração celular. Adaptado de Nakada et al. (2006).

Mesmo diante de tão avançado padrão invasivo, raramente as células de glioma invadem o lúmen dos vasos sanguíneos, caracterizando um

comportamento não metastático dessas células. Este padrão de invasividade sugere que estes neoplasmas são adaptados para o microambiente especificamente presente no SNC (Bellail et al., 2004).

1.2 Matriz Extracelular do Sistema nervoso Central e dos Gliomas

A matriz extracelular (MEC) compreende uma complexa rede de proteínas e polissacarídeos que preenchem o espaço intercelular. As células produzem todos os componentes da MEC e ao mesmo tempo são drasticamente afetadas por estas moléculas. Isto é particularmente claro no SNC, onde a MEC influencia em muitos aspectos do desenvolvimento, incluindo diferenciação e direcionamento axonal (Sobeih e Corfas, 2002). O espaço extracelular do cérebro é um importante microambiente do sistema nervoso e um canal de comunicação para as células nervosas, além de ser dinamicamente alterado durante a atividade, desenvolvimento e amadurecimento axonal e ainda em estados patológicos (Zámecknik et al., 2003). No SNC, após uma injúria, a composição e quantidade das moléculas da MEC aumentam significativamente (Goldbrunner et al., 1999).

A distribuição de glicoproteínas e proteoglicanas estruturais na MEC são unicamente reguladas pelo sistema de cada órgão ou tecido específico que as produza (Goldbrunner et al., 1999). Estudos mostram que a MEC abrange um expressivo percentual do volume do parênquima cerebral e é composta principalmente de hialuronan, proteoglicanas, tenascina C (durante o desenvolvimento cerebral) e trombospondina (Bellail et al., 2004). A membrana basal vascular e subpial contêm proteínas como colágeno tipo I, II e IV, bem como fibronectina, laminina e uma variedade de proteoglicanas. Uma composição

similar também é encontrada no espaço subependimal e na região inferior às células epiteliais do plexo coróide (Goldbrunner et al., 1999)

Interações estroma-tumor apresentam um papel central na regulação da progressão e malignidade tumoral. Durante o desenvolvimento neoplásico, ocorre um contínuo remodelamento da infraestrutura da MEC sob controle das células neoplásicas e alterações no conteúdo de proteoglicanas, afetando a progressão, invasão e o crescimento do tumor (Aguiar et al., 2002). Inúmeros componentes da MEC tem sido propostos como possíveis moléculas chave para o fenótipo invasivo dos gliomas, isto inclui várias glicoproteínas como colágeno, laminina, fibronectina, tenascina, vitronectina e proteoglicanas como condroitina sulfato e ainda o ácido hialurônico (Tysnes et al., 1999). A laminina é amplamente expressa pelos vasos sangüíneos hiperplásicos e tem sido demonstrada como sendo um promotor inicial da migração das células de glioma (Chintala & Rao, 1996; Goldbrunner et al., 1999; Tysnes et al., 1999). Tumores cerebrais apresentam um aumento da expressão de tenascina C de acordo com o aumento do grau de malignidade do tumor (Bellail et al., 2004). Em contraste, o tecido cerebral normal maduro não expressa tenascina (Goldbrunner et al., 1999), a qual mostra-se como um importante fator angiogênico para o tumor, caracterizando então, um importante alvo para a terapia anti-angiogênese (Bellail et al., 2004).

Os gliomas podem obviamente produzir sua própria matriz extracelular quando necessário, mas também, oportunamente, fazem uso da matriz disponível no local onde suas células se fazem presentes (Goldbrunner et al., 1999).

1.3 Sistema Purinérgico

Além de sua função energética, nucleotídeos e nucleosídeos representam uma importante e ubíqua classe de moléculas extracelulares que interagem com receptores específicos, ativando vias de sinalização intracelulares (Burnstock, 1998). O ATP pode ser armazenado em vesículas no interior das células podendo ser co-liberado com moléculas excitatórias como acetilcolina, glutamato e o GABA (Fields e Stevens, 2000). Em resposta a inúmeros estímulos biológicos e/ou mecânicos, as células liberam ATP ao seu redor, desencadeando respostas fisiológicas nas células adjacentes (Figura 4) (Novak, 2003).

Nas interações neurônio-glia, o ATP também constitui uma molécula de sinalização. Quando liberado pelos astrócitos pode contribuir para respostas celulares específicas a traumas e também a isquemias, isso por iniciar e manter a astrogliose reativa, o que envolve mudanças na proliferação e morfologia não só dos astrócitos, mas também na microglia (Burnstock, 2006).

1.3.1 Receptores purinérgicos

Nucleotídeos e nucleosídeos medeiam um considerável número de efeitos sobre neurônios e células gliais incluindo proliferação e diferenciação celular, crescimento axonal, síntese e liberação de fatores tróficos como FGF-2 e NGF (Zimmermann, 2006). Tais efeitos são mediados via receptores específicos, sendo subdivididos em duas classes, P1 e P2 (Ralevic e Burnstock, 1998). Os receptores do tipo P1 são sensíveis à adenosina e apresentam-se ligados a vias de sinalização intracelulares que desempenham importantes papéis na sobrevivência das células (Zimmermann, 2006). O grupo dos receptores P2

demonstra grande preferência por nucleosídeos di- e trifosfatados, como ATP e ADP, consistindo de duas grande famílias, os P2X e os P2Y (Novak, 2003).

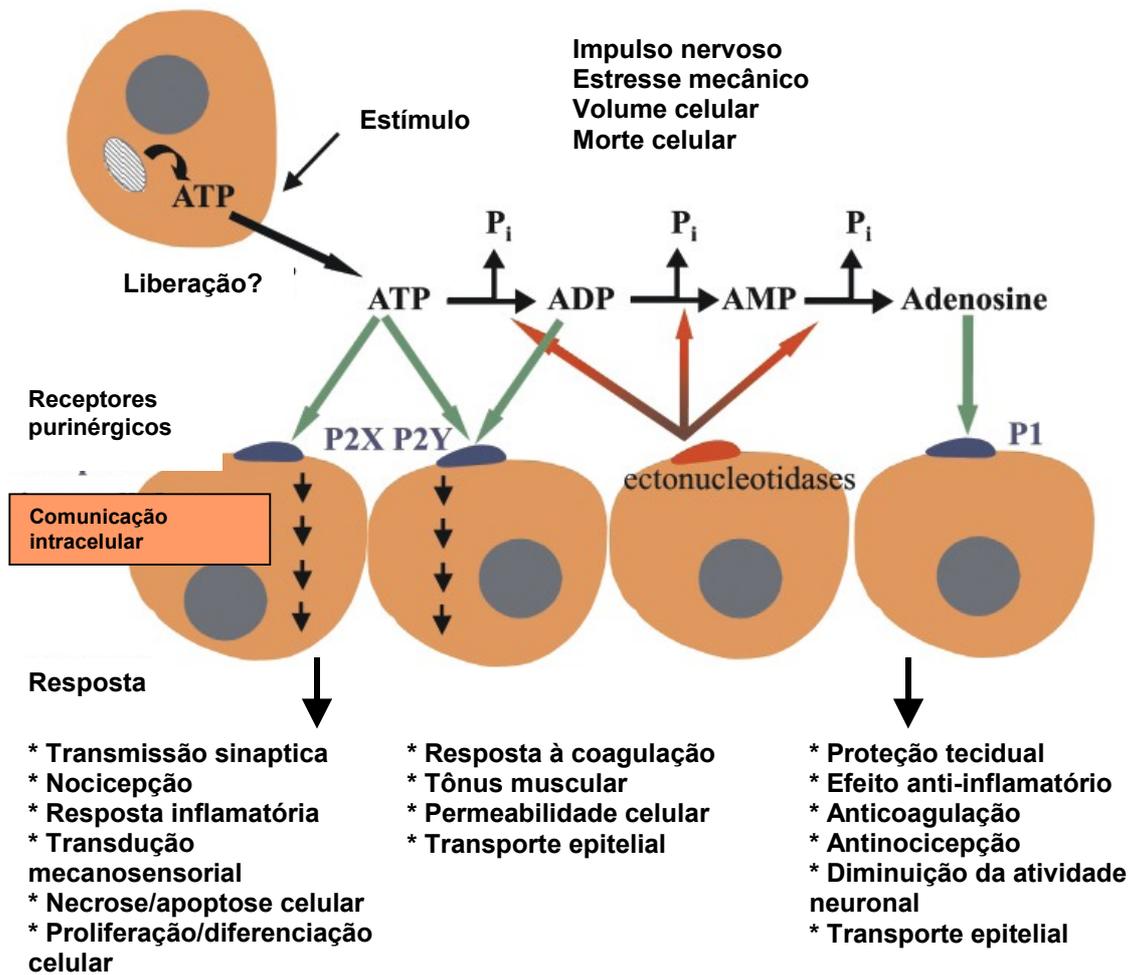


Figura 4: Esquema demonstrativo dos estímulos que levam à liberação do ATP e os efeitos que ele desencadeia nas células circundantes, através da ativação de seus receptores e ainda o bloqueio destes sinais através da degradação deste nucleotídeo até adenosina, pela ação das ectonucleotidasas. Adaptado de Novak (2003).

Os P2X são considerados receptores ionotrópicos, geralmente sensíveis ao ATP e induzem um grande influxo celular de cátions, como Na^+ e Ca^{2+} , por

formarem poros na membrana plasmática. Isso leva a uma rápida despolarização da célula, ativando cascatas de sinalização intracelulares Ca^{2+} -dependentes. Já foram clonados sete diferentes exemplares dentro desta família (P2X₁- P2X₇).

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_{1,2,3,4,6,11,12,13} e ₁₄) e são sensíveis à purinas e pirimidinas di- e trifosfatadas (Zimmermann, 2006; Donnelly-Roberts et al., 2007; North e Verkhatsky, 2006; Fields e Burnstock, 2006; Novak, 2003).

1.3.2 A família das ectonucleotidases

Os efeitos mediados por nucleotídeos são controlados pela degradação enzimática dessas moléculas, através de uma cascata de hidrólise que resulta na formação do respectivo nucleosídeo e fosfato livre (Zimmermann, 2000).

Existem inúmeras enzimas envolvidas no metabolismo purinérgico, e estas apresentam uma variada topografia de membrana com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Elas encontram-se agrupadas nas famílias das E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases) (figura 5), das E-NPP (ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterases) e também das alcalino fosfatases (figura 6). Todas apresentam a característica em hidrolizar nucleosídeos 5`di- e trifosfatados. Já os respectivos nucleosídeos 5`monofosfatados são hidrolisados pela enzima ecto 5`nucleotidase (ecto 5`-

NT/CD73) (Zimmermann, 2001). Quando o AMP é hidrolisado por esta última enzima, ocorre a liberação do nucleosídeo adenosina o qual pode sofrer subsequente degradação à inosina, pela enzima adenosina deaminase ou ainda ser recaptado pelas células, através de transportadores bidirecionais constituindo a via de salvação das purinas (Figura 7).

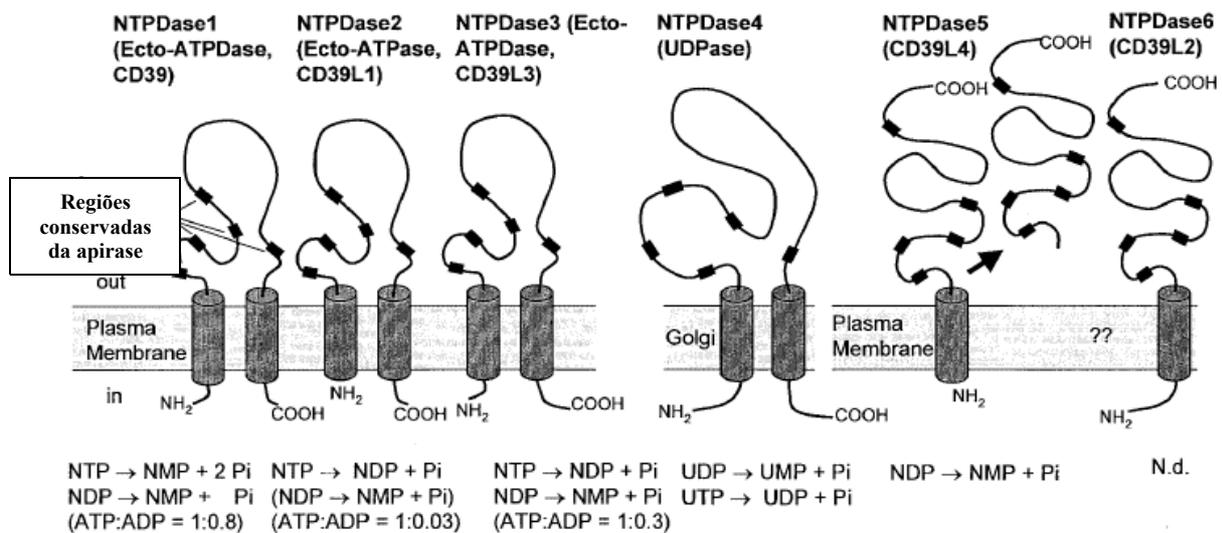


Figura 5: Família das E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases), representação topográfica de membrana, nomenclatura de seus membros e relação de hidrólise, apresentados por cada enzima. Adaptado de Zimmermann (2000).

As ectonucleotidasas em geral, podem variar consideravelmente em inúmeros aspectos, no entanto, todas apresentam 5 seqüências idênticas, denominadas de regiões conservadas da apirase (ACRs). Devido a presença das ACRs, atribui-se a semelhança destas enzimas em sua atividade catalítica (Zimmermann, 2001). Cabe ressaltar que essas enzimas fazem uso de cátions divalentes como Ca²⁺ e Mg²⁺ além de pH alcalino para atingirem sua atividade máxima (Yegutkin, 2008).

Estudos demonstraram que as E-NTPDases são expressas por astrócitos de diferentes regiões do SNC, variando a intensidade de expressão e atividade catalítica, assim como a relação hidrólise ATP/ADP (Wink et al., 2003a). Contudo, esse equilíbrio enzimático sofre alterações em resposta a lesões, onde ocorre um aumento da expressão dessas enzimas, principalmente em astrócitos corticais e microglia (Nadeljkovic et al., 2006). Linhagens celulares de glioblastoma multiforme em cultura mostraram um perfil de expressão dessas enzimas inverso ao apresentado por astrócitos em cultura, mostrando-se quase incapazes em degradar o ATP extracelular, sugerindo então um papel positivo para este nucleotídeo na progressão desses tumores (Wink et al., 2003b).

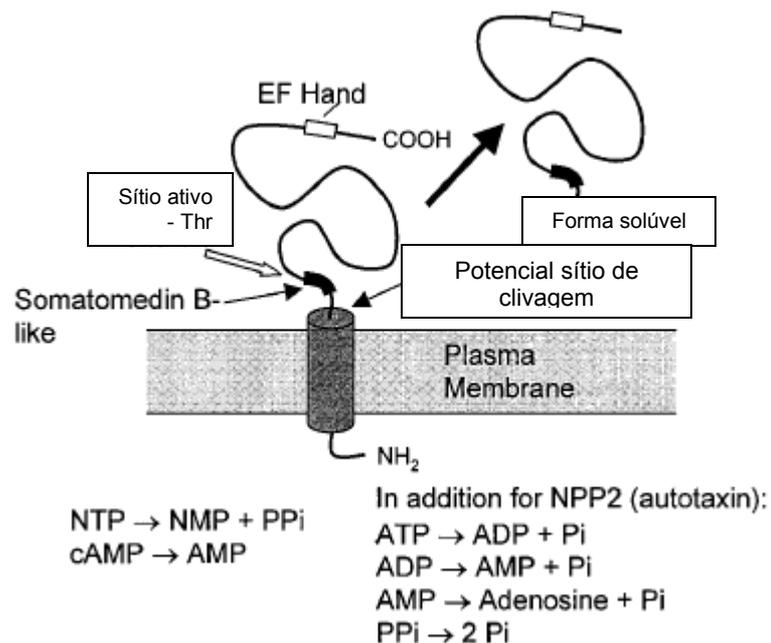


Figura 6: Representação gráfica da família das E-NPP (ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterases) e também das alcalino fosfatases. Adaptado de Zimmermann (2000).

1.3.3 Ecto-5'-nucleotidase e adenosina

A ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT/CD73) está localizada na superfície externa das células, ancorada à membrana plasmática por resíduos de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e hidrolisa exclusivamente nucleosídeos monofosfatados. Ela apresenta máxima atividade catalítica na presença de Mg^{2+} além de ser considerada uma metalo-enzima por apresentar átomos de zinco fortemente ligados à sua estrutura. Os nucleotídeos ATP, ADP e adenosina 5'-[α - β -metileno-difosfato] (APCP), são inibidores competitivos da ecto-5'-NT e altamente efetivos (Zimmerman, 1992; Zimmermann, 2000; Zimmemann, 2006).

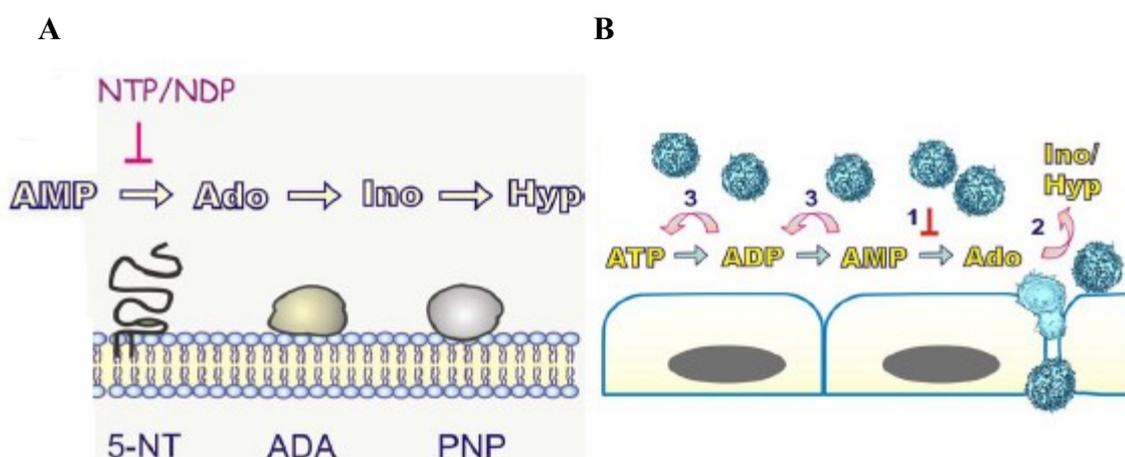


Figura 7: Formação de adenosina e seus subseqüentes subprodutos, a partir da hidrólise do AMP pela ecto-5'-NT (B). Recaptação da adenosina (B). Adaptado de Yegutkin (2008).

A ecto-5'-NT, também é denominada como CD73, isso por se altamente expressa por linfócitos B e T, constituindo então um marcador de maturação para estas células (Sunderman, 1990). Outras funções não enzimáticas são ainda

atribuídas a esta molécula como a indução de vias de sinalização intracelulares e mediação da adesão célula-célula e célula-matriz (Yegutkin, 2008). Esta enzima pode ainda ser encontrada na forma solúvel, após sofrer clivagem no segmento de ligação do GPI (Zimmermann, 2000).

Uma abundante expressão desta enzima é encontrada no cólon, rins, cérebro, fígado, coração e pulmão, sendo ainda predominantemente associada com o endotélio vascular (Yegutkin, 2008). Assim como ocorre com as E-NTPDases, a ecto-5'-NT também tem sua expressão aumentada no córtex cerebral, em resposta a lesões (Nadeljkovic et al., 2006). No caso do rompimento de células do SNC, uma grande quantidade de ATP é liberado para o meio extracelular. Este nucleotídeo em níveis elevados assume condições de citotoxicidade para o tecido cerebral normal. O aumento da expressão e atividade das enzimas que metabolizam o ATP, constitui uma via de reparo do tecido, com uma aumentada produção de adenosina, a qual possui características neuroprotetoras e pró-angiogênicas (Braun et al., 1997);

Adenosina (ADO), um ubíquo nucleosídeo púrico, é considerada um regulador fisiológico de várias atividades celulares tais como crescimento, diferenciação e morte. Quando presente no meio extracelular, ela exerce suas funções através da sinalização de seus receptores (P1), que são subdivididos em A_1 , A_{2a} , A_{2b} e A_3 . Todos são acoplados à proteína G, levando à sinalização intracelular dependente da proteína PKC e ainda regulando as concentrações de AMPc. Seus receptores específicos são encontrados em quase todos os tipos de células e a regulação de sua liberação controlada de acordo com o sistema encontrado no órgão local. Resumindo suas funções, no coração a adenosina induz efeitos cardioprotetores, no SNC exerce função neuroprotetora, ela afeta o

sistema imune, devido sua atividade anti-inflamatória através da inibição da liberação de citocinas e agregação plaquetária e ainda modula a função linfocitária (Ohana et al., 2001; Borowiec et al., 2006; Spycala, 2000).

1.4 Relação entre gliomas, ecto-5'-nucleotidase e matriz extracelular

Como mencionado anteriormente, os gliomas apresentam alterações no metabolismo dos nucleotídeos extracelulares quando comparados às células normais do SNC. Dentre estas alterações a ecto 5'-NT tem seus níveis de expressão aumentados em linhagens de células de glioma em cultura (Wink et al., 2003b). Experimentos realizados com linhagens de células de melanoma, as quais apresentavam diferentes graus de malignidade, mostraram que quanto maior o grau do tumor, mais intensa era a expressão da ecto 5'-NT (Sadej et al., 2006). Outros estudos mostram que a adenosina, principal produto da hidrólise da ecto5'-NT, exerce inúmeros efeitos sobre as células tumorais que beneficiam a malignidade. Dentre estes efeitos listam-se a proteção contra isquemia, estimulação do crescimento e angiogênese, além da supressão da resposta imune contra as células tumorais (Spychala, 2000).

Além de sua importante função como enzima, a CD73 é descrita por interagir com moléculas da matriz extracelular, principalmente glicoproteínas como laminina e fibronectina. Esta interação leva a alterações na atividade hidrolítica da ecto-5'-NT (Dieckhoff et al., 1985; Méhul et al., 1993; Stochaj et al., 1989). Avaliações na expressão e atividade da ecto-5'-NT em diferentes linhagens de células de câncer de mama, na presença de seu inibidor competitivo, APCP, mostraram uma diminuição da atividade da enzima e redução

nas características relacionadas a malignidade deste tumor (Zhou et al., 2007a). A superexpressão da ecto-5'-NT realizada também em linhagens celulares de câncer de mama, mostrou um significativo aumento nos eventos de adesão, migração e invasão destas células, sugerindo o envolvimento da CD73 nos processos de invasibilidade destas células (Zhou et al., 2007b). Diante do conhecido envolvimento da matriz extracelular e da ecto 5'-NT/CD73 nos processos de invasão de células tumorais e da interação já demonstrada entre ambas, idealiza-se que haja uma possível integração de ambas propiciando assim o desenvolvimento tumoral.

2. OBJETIVOS

Diante dos dados apresentados, esta dissertação tem por objetivo avaliar a possível relação entre moléculas da matriz extracelular com a enzima ecto 5'-nucleotidase, verificando alterações na atividade hidrolítica desta enzima e ainda, observar alterações nos comportamentos de proliferação, adesão e migração celular, na linhagem de células de glioma humano U138-MG, frente a exposição a diferentes componentes da matriz extracelular e o inibidor da enzima em questão.

3. RESULTADOS

3.1 Effect of extracellular matrix components on ecto-5'-nucleotidase activity, proliferation, adhesion and cellular migration of U138-MG human glioma cell line

Artigo a ser submetido à revista Journal of Neuro-Oncology.

3.1.1 Normas para submissão

Title Page

- The title page should include:
 - ⇒ The name(s) of the author(s)
 - ⇒ A concise and informative title
 - ⇒ The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
 - ⇒ The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

- ⇒ Please provide an abstract of 100 to 150 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

- ⇒ Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

- ⇒ Use a normal, plain font for text
- ⇒ Use italics for emphasis.

⇒ Use the automatic page numbering function to number the pages.

⇒ Do not use field functions.

⇒ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

⇒ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

⇒ Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

⇒ Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Abbreviations

⇒ Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Acknowledgments

⇒ Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Citation.

⇒ Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

⇒ The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

**EFFECT OF EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENTS ON ECTO- 5'-
NUCLEOTIDASE ACTIVITY, PROLIFERATION, ADHESION AND CELLULAR
MIGRATION OF U138-MG HUMAN GLIOMA CELL LINE**

Angélica Regina Cappellari, Luci Bavaresco, Gabriela Jouglard Vasques,
Elizandra Braganhol and Ana Maria Oliveira Battastini*

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

* Corresponding author:

Ana Maria Oliveira Battastini

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

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

Telephone number: 55 (51) 3308-5554

FAX number: 55 (51) 3308-5535

e-mail: abattastini@gmail.com

Abstract

Glioblastoma multiforme is an aggressive form of brain tumor that shows a strongly invasiveness and present high activity of the ecto-5'-nucleotidase which can contact with extracellular matrix components. In present work we showed an inhibition of enzymatic activity of ecto-5'-nucleotidase of the U138 human glioma cell line in the presence of laminin and fibronectin or laminin together dextran sulfate. We observed a reduction in cell proliferation in presence of dextran sulfate alone (37%) and in combination with collagen type I (28%) or laminin (29%). The presence of adenosina decreased of adhesion at about 40% and APCP increased in 75%. Laminin inhibited cell adhesion and chondroitin sulfate increased in 70%. When dextran sulfate was added alone, U138 cells presented a induction of cell migration and adhesion. These results suggest the modulation of ecto-5'-nucleotidase activity and production of adenosin by extracellular matrix molecules, affect cell events involved in the invasiveness behavior this tumor cells.

Key words: Ecto-5'-NT/CD73; extracellular matrix; glioblastoma multiforme, invasiveness.

1 Introduction

Gliomas are the main primary and the most malignant brain tumors been almost uniformly fatal [21]. The mean of survival is small after surgical resection and changes with tumor grade [11]. Current standard-of-care therapies include surgery, radiation and chemotherapy. In the meantime several novel therapeutic approaches, which include molecular targeted therapy, immunotherapy, gene therapy and other delivery systems of therapeutics agents, may increase therapeutic efficacy [21].

Changes in morphology are observed in the process of malignant transformation and it reflects the sequential acquisition of molecular changes as altered expression of PTEN, EGFR and gene p53 mutation [11; 19]. The main features of gliomas are the high invasibility in healthy brain. This process consists initially in the detachment of the glioma cells from original site, adhesion to specific extracellular matrix (ECM) proteins, liberation of proteases that degrades this ECM and finally the migration [16].

The extracellular space of the brain is an important microenvironment of the nervous system and a communication channel for nerve cells, besides to be dynamically changed by the activity, development and to axonal mature as well in pathological state [32]. In the central nervous system (CNS), after injury, the molecular composition and the quantity of the ECM significantly increases [10].

Stroma-tumor interaction shows a central role in the regulation of the tumoral malignancy and progression. For the neoplastic development, a continuous remold of the structural ECM is controlled by glioma cells [1]. Several ECM components have been proposed to be possible key molecules for invasiveness

phenotype of gliomas. These include collagens, laminins, fibronectins, tenascins, vitronectin, osteopontin, chondroitin sulfate proteoglycans and hyaluronic acid [25]. The gliomas are able to produce its own ECM when necessary, as well, opportunistically use of a variable ECM already present [10].

ATP is an important signaling molecule in the CNS molecule that may be involved in glioma development [15]. Extracellular ATP is metabolized by ectonucleotidases that hydrolyze ATP to AMP with liberation of Pi. The AMP is converted to adenosine by the ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73) [35; 36]. Some these enzymes are widely expressed in the normal CNS as NTPDase1 and ecto-5'-NT [30], being altered in injury conditions [17]. In previous studies, we showed the involvement of the purinergic system in glioma proliferation [14] and the altered metabolism of extracellular ATP [31] in different glioma cell lines. Therefore, the purinergic system may be a novel and important mechanism associated with the malignancy of these tumors.

Several studies showed the participation of ecto-5'-NT/CD73 *per se* as a proliferative factor, being involved in the control of cell growth, cell-cell and cell-matrix interactions [28, 3, 20, 29], in drug resistance [26] and tumor promoting functions [23]. Ecto-5'-NT/CD73 interacts with extracellular matrix molecules, mainly glycoproteins laminin, that alter its the enzymatic activity [9; 24; 13].

Recently it was showed that the overexpression of ecto-5'-NT in breast cancer cell lines increased cellular adhesion, migration and invasiveness [34] and that melanoma cell lines of high malignance grade present an elevated expression of ecto-5'-NT/CD73 [20]. In addition, the effect of adenosine on tumor cells is favorable for growth, angiogenesis and immune response suppression was previously reported [23].

Considering the potential role of the ecto-5'-NT/CD73 as an extracellular signaling step in the induction of cell-cell and cell-matrix adhesion and that ecto-5'-NT/CD73 has been proposed to interact directly with components of extracellular matrix, the objective of the present work was to evaluate the effect of different components of extracellular matrix on ecto-5'-NT/CD73 activity in the U138MG glioma cell line. The possible relationship between this enzyme and the different components of ECM on the proliferative, adhesive and migration behavior of this cell line was also investigated.

2 Material and Methods

2.1 Chemicals

Cell culture medium, penicillin/streptomycin and trypsin/ EDTA solution were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). APCP (α,β -methylene ADP), DMSO (dimethylsulphoxide), AMP, adenosine and the extracellular matrix components were obtained from Sigma (Sigma, St. Louis, USA). Fetal bovine serum was purchased from Cultilab (Cultilab, Campinas, SP, Brazil). All other chemicals used were of analytical grade.

2.2 Cell culture

The human glioblastoma cell line U138-MG (derived from spontaneously occurring human malignant gliomas) was obtained from the American Type Culture Collection - ATCC - (Rockville, Maryland, USA). The cells were grown and

maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.5 U/mL penicillin/streptomycin antibiotics, and supplemented with 15% of fetal bovine serum (FBS). Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air. The glioma cells were seeded in 24 multiwell plates (10³ cells/well) for the enzymatic assay and cellular proliferation experiments or in 12 multiwell plates (2.10³ cells /well) for migration experiments in 500 µL medium per well. The cells were grown and after 48h the culture medium was removed and the FCS concentration was reduced to 7% for 24h and finally to 0,5% when the treatments were started.

2.3 Treatments

The different glycoproteins of the extracellular matrix proteins, collagen type I, fibronectin and laminin were used at final concentration of 15 µg/ml. The two different glycosaminoglicans, chondroitin sulfate and dextran sulfate at final concentration of 2 mg/ml. Adenosine was tested at 100µM, APCP (α,β-methylene ADP) was dissolved in cell culture-grade dimethylsulphoxide (DMSO), and tested at a final concentration of 1µM. Control cells were processed simultaneously and were treated with DMSO and the final concentration was of 0,2% in the medium.

2.4 Ecto-5'-NT assay

The ecto-5'-NT/CD73 activity was assayed as described by Wink et al. [30]. After different culture times, conditions and/or treatments, the 24 multiwell plates containing glioma cells were washed three times with phosphate-free

incubation medium in the absence of substrate. The reaction was started by the addition of 200 μ L of incubation medium containing 2mM MgCl₂, 120mM NaCl, 5mM KCl, 10mM glucose, 20mM Hepes, pH 7.4 and 2mM of AMP at 37 °C. After 10 min of incubation the reaction was stopped by taking an aliquot of the incubation medium, which was transferred to eppendorf tubes containing trichloroacetic acid (final concentration 5%, w/v) previously placed on ice. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by malachite green method [6], using KH₂PO₄ as a Pi standard. The non-enzymatic Pi released from nucleotide into the assay medium without cells was subtracted from the total Pi released during the incubation, giving net values for enzymatic activity. Specific activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.5 Protein Determination

Cells in the 24-well microplates were solubilized with 100 μ L NaOH (1.0 M) and frozen overnight. An aliquot was collected and protein was measured by the Coomassie blue method [5] using bovine serum albumin as standard. The protein determinations were carried out in all experiments.

2.6 Cell counting

At the end of different culture times, conditions and/or treatments, the medium was removed, cells were washed 2 times with phosphate buffered saline (PBS) and 100 μ L de 0,25% trypsin/EDTA solution was added to detach the cells, which were counted immediately in a hemocitometer.

2.7 Adhesion Assay

After different treatments, the glioma cells were seeded at density of $2 \cdot 10^3$ cells/well in 96-well plates and incubated for 2 hours at 37°C in an incubator at 37°C, with a 5% CO₂ enriched atmosphere. After this, the non-adherent cells were removed by washing carefully three times with PBS. Adherent cells were fixed with 4% formol for 10 min, and stained with 100µL 0,5% crystal violet diluted in 20% methanol for 10 minutes. The cells were then washed three times with Milli-Q water and the stain was eluted with 100µL 10% acetic acid (v/v). The amount of staining was analyzed by optical density (OD) in microplate reader at 570 nm. The results were expressed as optical density at 540nm [1, 29].

2.8 Migration Assay

The migration assay was performed as described by Valster [27]. Briefly, before plating the cells in the 12 multiwell plates, two parallel lines are drawn at the underside of the plates with a Sharpie Marker. These lines served as fiducially marks for the wounded areas to be analyzed. The cells were cultured and treated as above described (item 2.2 and 2.3). At day of analysis, the monolayer should be at 70% of confluence. In the preparation to make the wound, the culture medium was aspirated and replaced by 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 lines with a yellow P200 pipette tip. This procedure makes possible to image the entire width of the wound

using a 10x objective. The wounds are observed using phase contrast microscopy on an inverted microscope. Images were taken at regular intervals of 12 hours starting at 0 and finishing at 48 hours. Images are analyzed by digitally drawing lines (using Adobe Photoshop) averaging the position of the migrating cells at the wounded edges. The cell migration distance is determined by measuring the width of the wound divided by two and by subtracting this value from the initial half-width of the wound.

2.9 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SE and analyzed for statistical significance by one-way Anova followed by Tukey post-hoc. Differences between mean values were considered significant at $p < 0,05$.

3 Results

1.1 Ecto-5'-NT activity after treatment with different ECM components

To investigate whether components of ECM affect ecto-5'-NT/CD73 activity U138-MG glioma cells were treated with the glycoproteins collagen type I, fibronectin and laminin and the glycosaminoglycans chondroitin sulfate and dextran sulfate and incubated with AMP as described in Material and Methods. The AMP hydrolysis was not affected by these treatments after 24 hours (data not shown) however, after 48 hours it was observed an inhibition of the ecto-5'-NT/CD73 by

33%, 41% and 62% when the cells were treated with laminin, fibronectin plus dextran sulfate and laminin plus dextran sulfate, respectively (Table 1).

1.2 Cell proliferation after treatment with different ECM components

Next, to investigate a possible relationship between the effects of the different ECM on ecto-5'-NT/CD73 and cell proliferation, we also evaluated the effect of glycoproteins and glycosaminoglycans on cell proliferation of U138-MG human glioma cells (Table 1). It was observed that alone, only dextran sulfate reduced the cell proliferation by 37% when compared to the control. The association of dextran sulfate with collagen type I or laminin, reduced the cell proliferation by 28% and 29%, respectively. This result was obtained also for the association of collagen type I and chondroitin sulfate, with a 26% of reduction.

1.3 Effect of different proteins of extracellular matrix, APCP and adenosine in cell adhesion

Considering the potential role of ecto-5'-NT/CD73 in adhesion events in different cell lines [29] and a possible relationship between this enzyme and the different components of ECM, we examined the effect of adenosine (ADO), the enzymatic product of AMP hydrolysis, and APCP (α,β -methylene ADP), an ecto-5'NT/CD73 inhibitor, on adhesion of U138-MG glioma cell line in culture, alone or in the simultaneous presence of ECM components (Figure 1). The results showed that ADO promoted a significant decrease of about 40%, while APCP strongly increases in 75% the cell adhesion when compared to the control. In

addition, it was observed that collagen type I and fibronectin alone, did not modify significantly the cell adhesion in comparison to the control, but the stimulatory effect caused by APCP was reverted by the simultaneous treatment with these proteins (Figure 1A and B). When the cells were treated with laminin was observed a decrease in the cell adhesion in 50% (Figure 1C), a similar effect caused by adenosine. The inhibitory effect caused by adenosine and laminin separately did not change with the simultaneous presence of these substances, but the treatment with laminin reverted the stimulatory effect of APCP as it was observed for the other glycoproteins tested (Figure 1 C). Chondroitin sulphate (ChS) increased the cell adhesion in similar levels of APCP (75%) and this stimulatory effect was not affected by the simultaneous treatment with these two substances. It is important to note that ADO reverted the stimulatory effect of ChS (Figure 1D). In the presence of Dxt the adhesion of UI38 cell decreased around 45%. Treatment with Dxt plus adenosine showed a synergic effect on cell adhesion. In association with APCP, Dxt also reverted the effect of APCP (Figure 1E).

1.4 Effect of different extracellular matrix proteins, APCP and adenosine on cell migration

Figure 2 shows that collagen type I, fibronectin and laminin as well as chondroitin sulfate did not alter the cell migration. Adenosine and APCP did not change the migration of the cells, too. Among the substances tested, only the dextran sulfate (Dxt) showed an inhibitory effect on glioma cell migration from 24

h until 48 h of analysis in relation at the control (Figure 2E). The inhibitory effect caused by Dxt was not altered by the simultaneous presence of ADO or APCP.

4 Discussion

Gliomas are the most malignant form of CNS tumor [8]. They are characterized by highly diffuse and infiltrative growth into the surrounding normal brain tissue, which makes surgical resection very difficult [7]. To invade, the glioma tumor cells need detached the cell-cell interactions to link to the proteins of extracellular matrix. These ECM proteins are degraded by specific proteases secreted by the tumoral cells to open space around the tumor and subsequently the cells migrate and invade the normal brain tissue [16].

The ecto-5'-nucleotidase (ecto5'-NT/CD73), is a protein linked to membrane by glycosilphosphatidylinositol anchor. It catalyzes the final reaction of hydrolysis of ATP, converting AMP to adenosine [35], which has an important role in many physiological and pathological events including tumorigenesis [23]. Furthermore, ecto-5'-NT/CD73 seems to have other functions as a membrane protein potentially involved in adhesion and in promoting tumor invasiveness [20, 33, 29].

In the present work we evaluated some important process involved in the invasion of gliomas by accessing the effect of different ECM components on ecto-5'-NT/CD73, proliferation, adhesion and migration of U138-MG human glioma cells in culture.

Data reported by Olmo et al. [18] showed that ecto-5'-NT/CD73 activity of Rugli-cells, a lineage derived from a rat glioblastoma, was inhibited when treated with fibronectin and activated when treated with laminin indicating that

components of ECM can influence the enzymatic activity of ecto-5'-NT glioma cells. Our results showed that ecto-5'-NT activity of U138-MG cells was inhibited by laminin (33%), fibronectin plus dextran (41%) and laminin plus dextran (62%). These contradictory results could be explained by the different origin of these glioma cells. In addition, the results presented in Tabel 1 are in agreement with Aguiar and collaborators [2], which reported the effect of glycosaminoglycans and glycoproteins on C6 rat glioma cells proliferation, where it was showed that fibronectin in association with heparin or with chondroitin sulfate reduced the proliferation of this cell line. However, in the present work we did not observed a relation between the inhibition of the ecto-5'-NT activity and the cell proliferation inhibition, except in the case of laminin plus dextran sulphate treatment.

The reduction of ecto-5'-NT activity observed only when the cells were treated with dextran together with laminin or fibronectin can be attributed at the fact that this two glycoproteins present sites of binding for sulfated polysaccharides [2] and that polysaccharides as dextran is related to chelation of the divalent cations such as Mg^{2+} [22]. Therefore the ecto-5'-NT activity could decrease, due the reduction of the levels this its cofactor ion. Another explanation for these inhibitory effect is that integrins, glycoprotein receptors, are co-expressed with ecto- 5'-NT [20]. The interaction between glycoproteins and sulfated polysaccharides can maintain a proximity between ecto-5'-NT and these polysaccharides, causing an alteration in the enzyme activity. The stronger inhibition observed by the treatment with laminin plus dextran sulphate can be attributed at the possible synergic effect this treatment.

Another feature studied was the adhesion properties of glioma cells in culture. The results showed that the treatment with APCP, an ecto-5'-NT/CD73

inhibitor, caused a strong stimulation while adenosine significantly decrease the U138-MG cell adhesion. These findings showed the important influence of ecto-5'-NT in the adhesion glioma cell through the production of adenosine, which by the inhibition of adhesion behavior of the cells, could be involved in the invasiveness of tumor cells.

The glycoproteins collagen and fibronectin did not have effect on glioma cell adhesion in our assay conditions. However, they reverted the stimulatory effect caused by APCP. Considering that the cells were pre-incubated with this inhibitor 30 min before the glycoprotein treatment, a direct effect of APCP on the ecto-5'-NT protein can not be excluded. The effects obtained in cell adhesion in the presence of glycoproteins after the treatment with APCP could be explained by co-expression of ecto-5'-NT and different integrins as discussed before. The glycoproteins bound to its receptors, the integrins, could maintain the ecto-5'-NT activity, producing adenosine, and therefore reverting the effect of APCP.

Another intriguing finding of adhesion experiments was the similar stimulatory effect of chondroitin sulfate and the APCP, which was also reversed by adenosine. Several studies have suggested that cell surface proteoglycans are involved in the control of glioma cell growth, adhesion in invasion. The chondroitin sulfate lectican BEHAB is upregulated in malignant gliomas *in vivo* and was proposed to play a role in brain invasion [4]. Considering that chondroitin did not inhibit ecto-5'-NT (Table 1), probably the stimulatory effect of this glycosaminoglycan on cell adhesion is by a different mechanism even though it was reverted by adenosine.

The glycosaminoglycan dextran sulfate alone inhibited the proliferation, adhesion and cell migration of U138-MG glioma cells. This molecule is not

expressed in the CSN, thus the treatment of the cells with this molecule characterize the presence of a factor external, normally not finding in the brain. Considering that it did not affected the ecto-5'-NT alone (Table1) we could suggest that the dextran sulfate acts as an inhibitor of the invasiveness of glioma cells by activating others steps beyond of the ecto-5'-NT mediated mechanism.

Taking together all these findings suggest that ecto-5'-NT expressed by U138-MG glioma cell line has its activity altered in the presence of some glycoproteins and glicosaminoglicans and that these molecules affect differently the proliferation, adhesion and cell migration. Further studies are necessary to better understand the possible relations between the enzymatic activity of the ecto-5'-NT and the different effects of these ECM components on glioma invasion.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A.R.C. and G.J.V. thank CAPES/Brazil and FAPERGS fellowships.

References

[1] Aguiar C B N M, Garcez R C, Alvarez-Silva M, Trentin A G (2002) Undersulfatation of proteoglicans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. *Int J Develop Neurosci* 20:563-571.

[2] Aguiar C B N M, Garcez R C, Lobão-Soares B, Alvarez-Silva M, Trentin A G (2005) Glycosaminoglycans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell migration. *BMC Cell Biol* 6-31

[3] Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Purune, Smith D J, Jalkanen S (1995) CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med* 182: 1603-1608.

[4] Bellail A C, Hunter S B, Brat D J, Tan C, Meir E G V (2004) Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1046-1069

[5] Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

- [6] Chan K M, Delfert D, Junger K D (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157: 375-380
- [7] Chintala S K, Rao J S (1996) Invasion of human glioma: role of extracellular matrix proteins. *Front Biosci* 1:324-39
- [8] DeAngelis L M (2001) Brain tumors. *N Engl J Medic* 344,2: 114-123
- [9] Dieckhoff J, Mollenhauer J, Kühl U, Niggemeyer B, Mark K , Mannhers H G (1986) The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin modify the AMPase activity of 5'-nucleotidase from chicken gizzard smooth muscle. *Fed Europ Biochem Soc* 195: 82-86
- [10] Goldbrunner R H, Bernstein J J, Tonn J C (1999) Cell-Extracellular matrix interaction in glioma invasion. *Acta Neurochir* 141: 295-305
- [11] Kleihues P, Ohgaki H (1999) primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *J Neuro-Oncol* 1:44-51
- [12] Maher E A, Furnari F B, Bachoo R M, Rowitch D H, Lous D N, Cavenee W K, Depinho R A (2001) Malignant glioma, genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15:1311-1333
- [13] Mehul B, Doyennette-Moyne M-A, Aubery M, Codogno P, Mannherz H G (1992) Enzymatic activity and *in vivo* distribution of 5'-nucleotidase, an

extracellular matrix binding glycoprotein, during the development of chicken striated muscle. *Exp Cell Res* 203: 62-71

[14] Morrone F B, Jacques-Silva M C, Horn A P, Bernardi A, Schwartzmann G, Rodnight R, Lens G (2003) Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neuro-Oncol* 64:211-218

[15] Morrone F B, Oliveira D L, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink M R, Meurer L, Edelweiss M I A, Lens G, Battastini A M O (2006) In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cell Cancer* 6:226

[16] Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran, N L, Hoelzinger D B, Berens M E (2006) Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci* 64:458-478

[17] Nedeljkovic N, Bjelobaba I, Subasic S, Lavrnja I, Pekovic S, Stojkov D, Vjestica A, Ravic, Stojiljkovic M (2006) Up-regulation of ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rats. *Cell Biol Int* 30:541-546

[18] Olmo N, Turnay J, Risse G, Deutzmann R, Mark K, Lizarbe M A (1992) Modulation of 5'-nucleotidase activity in plasma membranes and intact cells by the extracellular matrix proteins laminin and fibronectin. *Biochem J* 282:181-188

- [19] Preusser M, Haberler C, Hainfellner J A (2006) Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. *Wien Med Wochenschr* 156/11-12:332-337
- [20] Sadej R, Spychala J, Skladanowski A C (2006) Expression of ecto-5'-nucleotidase (em, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Moma Res* 16:213-222
- [21] Sathornsumetee S, Rich J N, Reardon D A (2007) Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma. *Neurol Clin* 25:1111-1139
- [22] Schetinger M R C, Falquembach F, Michelot F, Mezzomo A, Rocha T (1998) Heparin modulates adenine nucleotide hydrolysis by synaptosomes from cerebral cortex. *Neurochem Int* 33:243-249
- [23] Spychala J (2000) Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 87:161-173
- [24] Stochaj U, Richter H, Mannherz H G (1989) Chicken gizzard 5'-nucleotidase is a receptor for the extracellular matrix component fibronectin. *Europ J Cell Biol* 51:335-338
- [25] Tysnes B B, Mahesparan R, Thorsen F, Haugland H K, Porwol T, Enger P O, Lund-Johansen M, Bjerkvig R (1999) Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas. *Int J Develop Neurosci* 17:531-539

- [26] Ujházy P, Berleth ES, Pietkiewicz JM, Kitano H, Skaar JR, Ehrke MJ, Mihich E (1996) Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance. *Int J Cancer* 68: 493-500.
- [27] Valster A, Tran n L, Nakada M, Berens M E, Chan A Y, Symons M (2005) Cell migration and invasion assays. *Methods* 37:208-215
- [28] Vogel M, Kowalewski HJ, Zimmermenn H, Janetzko A, Margolis RU, Wollny HE (1991) Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata*. *Biochem J* 278:199-202.
- [29] Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, Zhou P (2007) Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 134(3):365-372
- [30] Wink M R, Braganhol E, Tamajusuku A S K, Casali E A, Karl J, Barreto-Chaves M L, Sarkis J J F, Battastini A M O (2003) Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem Int* 43:621-628
- [31] Wink M R, Braganhol E, Tamajusu A S K, Schwartzmann G, Sarkis J J F, Battastini A M O (2003) Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer letters* 198:211-218

- [32] Zámečník J, Vargová L, Homola A, Kodet R, Syková E (2003) Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30:338-350
- [33] Zhi X, Sifeng C, Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, Yin L (2007) RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. *Clin Exp Metastasis* 24:439-448
- [34] Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, Yin L, Shao Z, Ou Z (2007) Overexpression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol Ther* 6(3): 426-431
- [35] Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Develop Res* 52:44-56
- [36] Zimmermann H (2006) Nucleotide signaling in nervous system development. *Eur J Physiol* 452:573-588

Legends

Figure 1- Effect of APCP, adenosine and ECM components on U138-MG cell adhesion. The semi-confluent cells were treated with the different ECM components, APCP, adenosine or a combination of them for 48 h. After that, the cell adhesion was evaluated as described in Material and Methods. **(A)** Evaluation of effects of the collagen type I and combinations as treatment; **(B)** Evaluation of effects of the fibronectin and combinations as treatment; **(C)** Evaluation of effects of the laminin and combinations as treatment; **(D)** Evaluation of effects of the chondroitin sulfate and combinations as treatment; **(E)** Evaluation of effects of the dextran sulfate and combinations as treatment. (—) represent value of control 100%. Data are the means \pm S.E.M. of five independent experiments. The control was considered 100 %. The values was statistically different in relation to control at * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$ or in relation to APCP at # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ and ### $p < 0,001$.

Figure 2: Cell migration using the monolayer wound healing assay in U138MG glioma cells. **(A)** Evaluation of effects of the collagen type I and combinations as treatment; **(B)** Evaluation of effects of the fibronectin and combinations as treatment; **(C)** Evaluation of effects of the laminin and combinations as treatment; **(D)** Evaluation of effects of the chondroitin sulfate and combinations as treatment; **(E)** Evaluation of effects of the dextran sulfate and combinations as treatment. Data are the means \pm S.E.M. of five independent experiments for each time point and condition. The values was statistically different in relation to control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$.

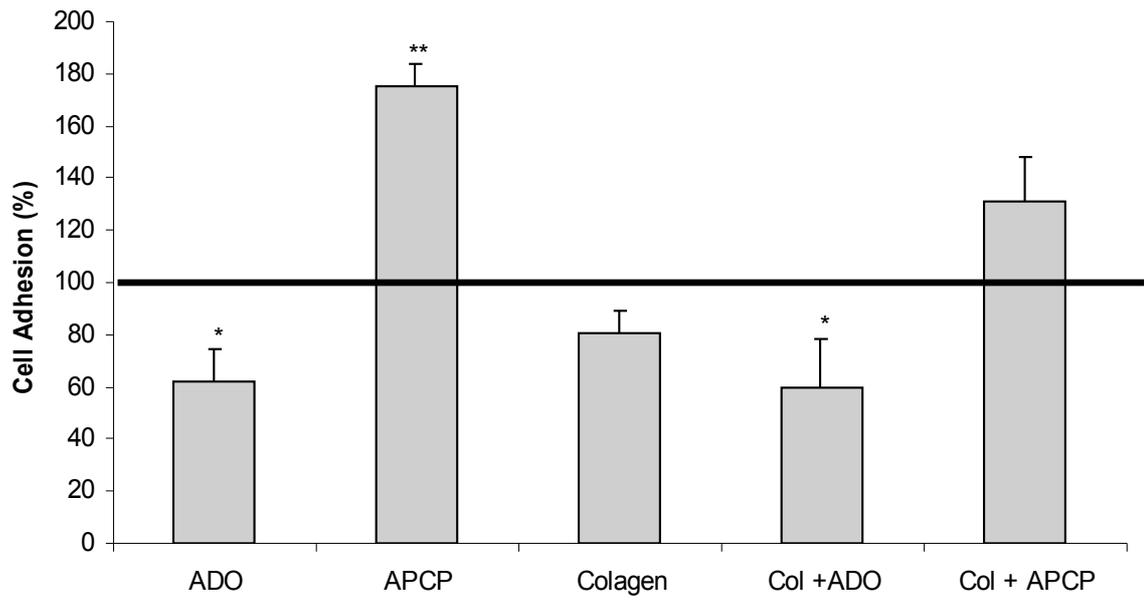
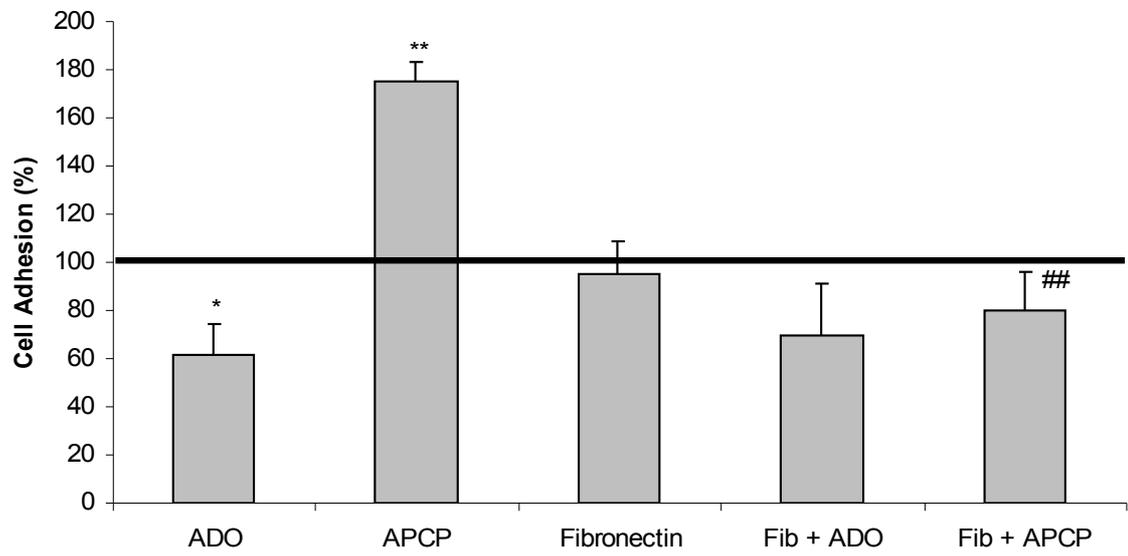
TABLE 1

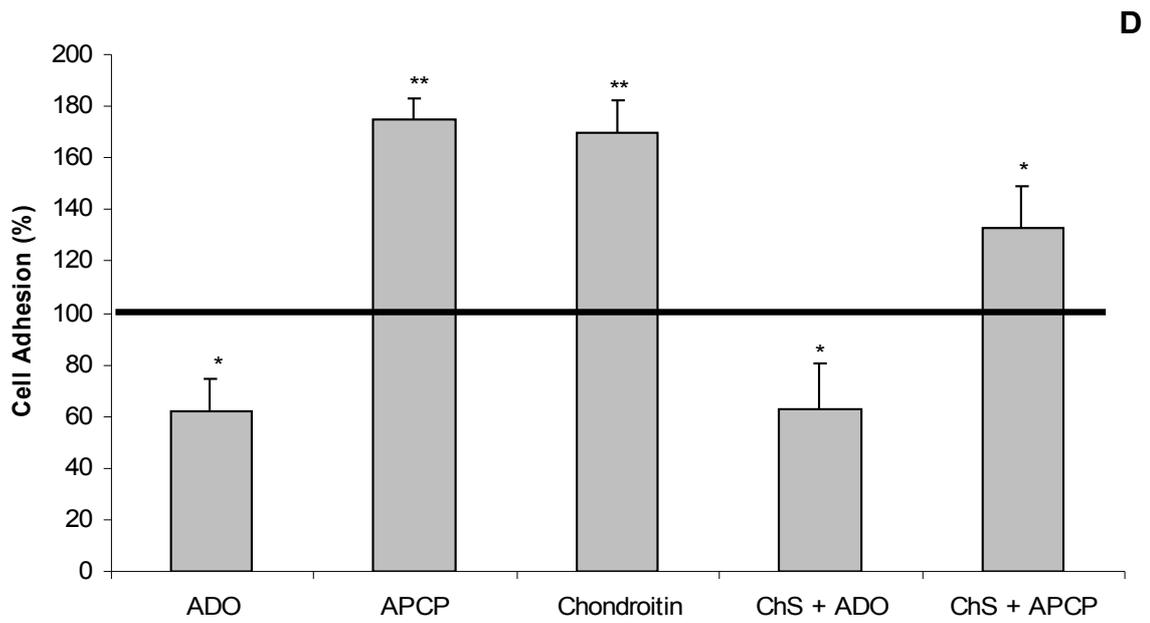
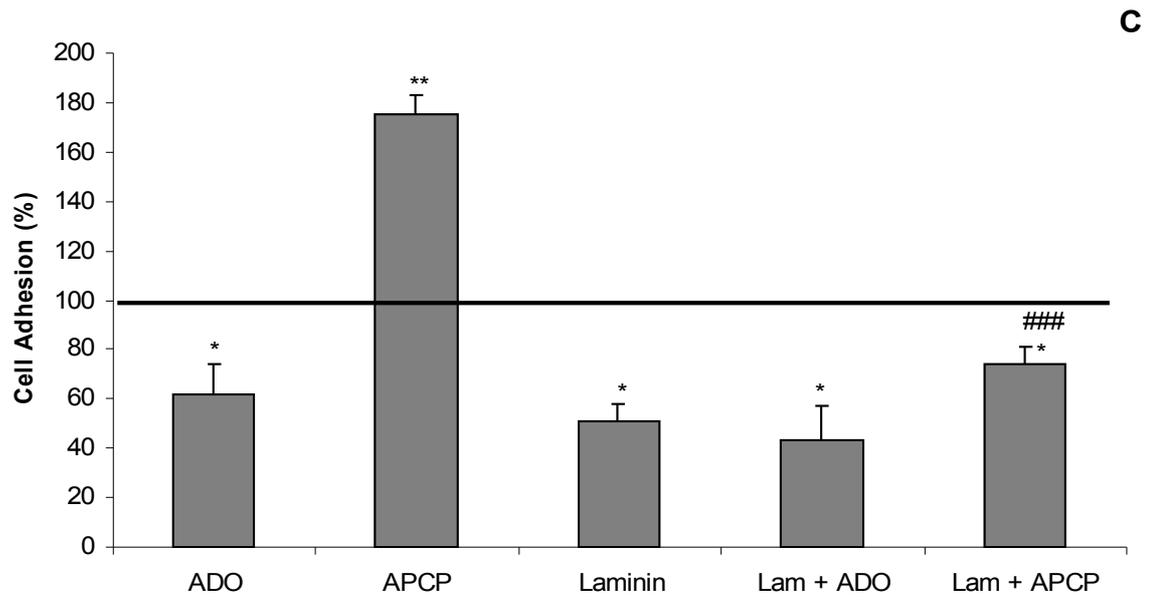
Effect of different components of extracellular matrix on ecto-5'-NT/CD73 activity and cell proliferation of U138-MG glioma cells.

<i>Treatments</i>	<i>% of control Mg²⁺-AMPase activity</i>	<i>Proliferation assay (%)</i>
Control	100	100
Colagen type I (col)	108 ± 3,68	92 ± 4,31
Fibronectin (fib)	102 ± 6,41	89 ± 5,72
Laminin (lam)	67 ± 2,33 *	97 ± 5,49
Chondroitin Sulfate (ChS)	125 ± 11,21	76 ± 2,65
Dextran Sulfate (Dxt)	79 ± 5,31	63 ± 3,80 **
Col + ChS	106 ± 2,99	60 ± 5,85 ***
Col + Dxt	108 ± 13,8	72 ± 1,93 *
Fib + ChS	96 ± 6,64	84 ± 11,10
Fib + Dxt	59 ± 8,96 *	86 ± 5,60
Lam + ChS	83 ± 12,32	81 ± 8,1
Lam + Dxt	38 ± 4,29 ***	71 ± 11,27 *

The cell cultures were incubated with the different treatments for 48h and were incubated with 2mM AMP or counted as described in Material and Methods. Control AMPase activity was 78,195±7,8 nmol Pi/min/mg. The absolute cell counting of the control was 85237±26255 cells . The values represent means ± SD from five independent experiments. The effect was statistically different in relation to the controls at *p<0,05, **p<0,01 and ***p<0,001 as determined by one-way ANOVA followed by Tukey test.

Figure 1

A**B**



E

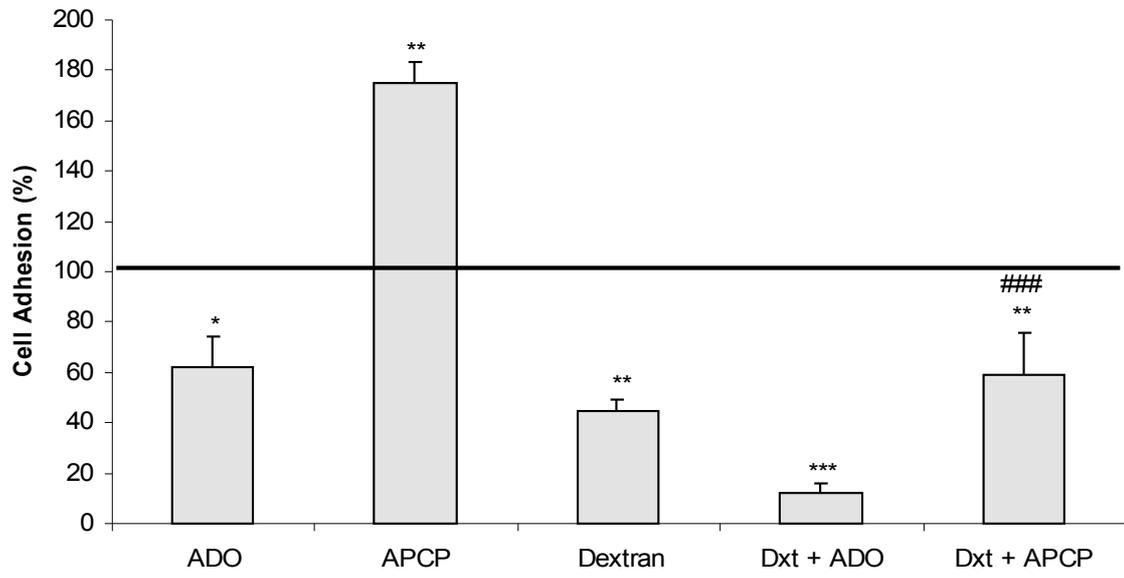
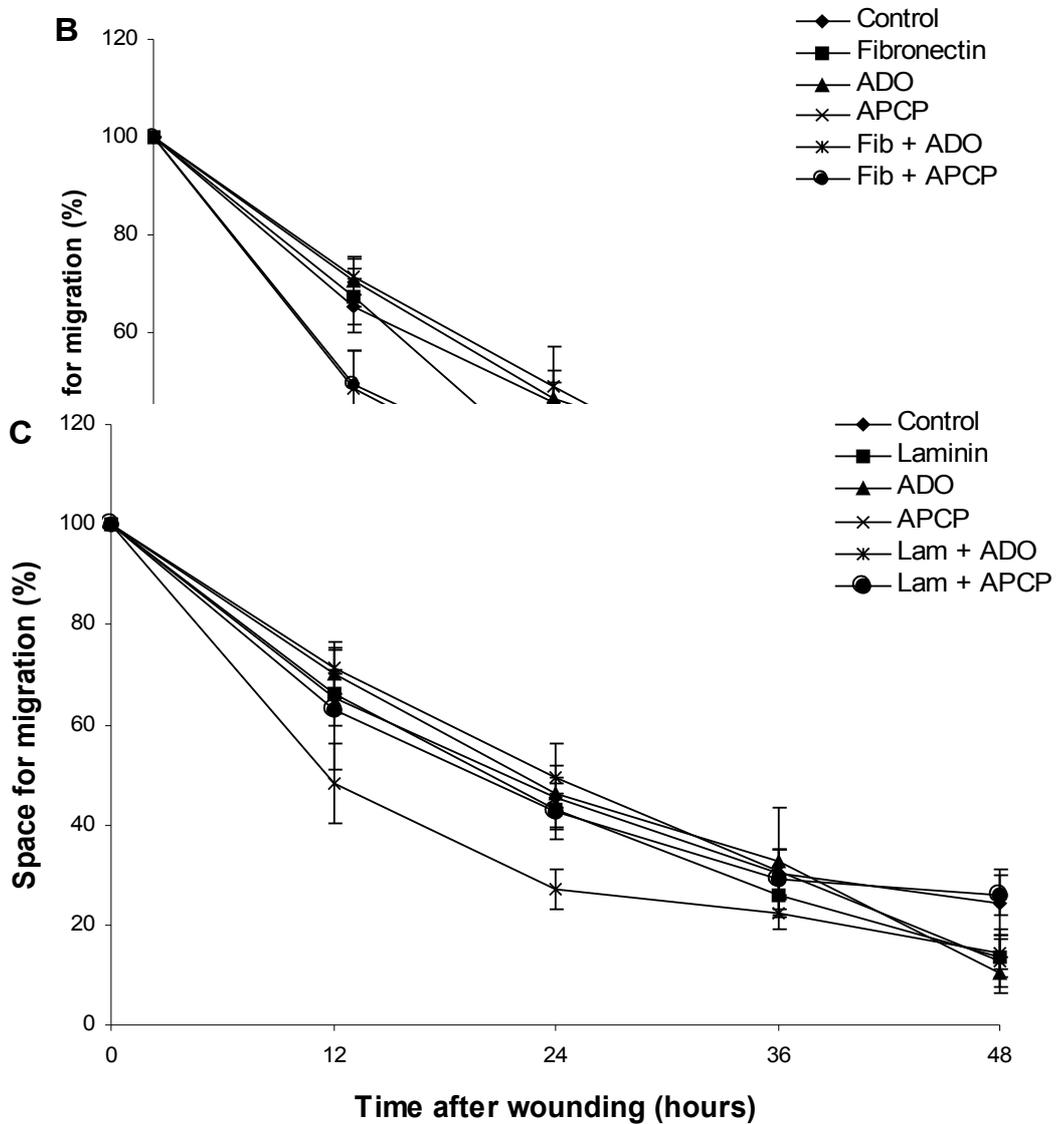
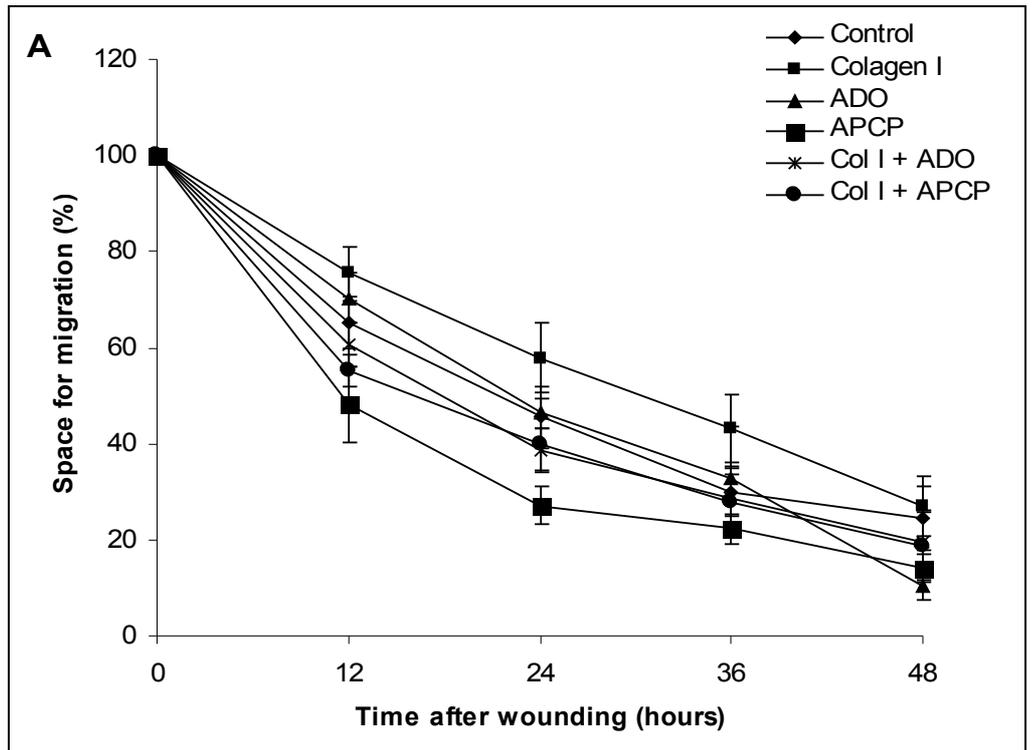
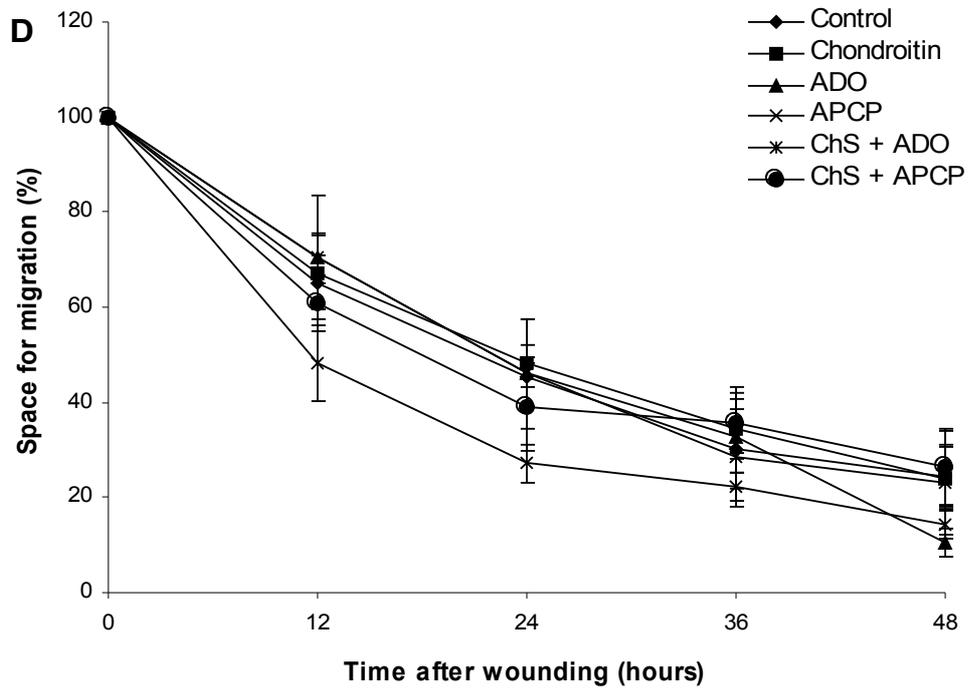
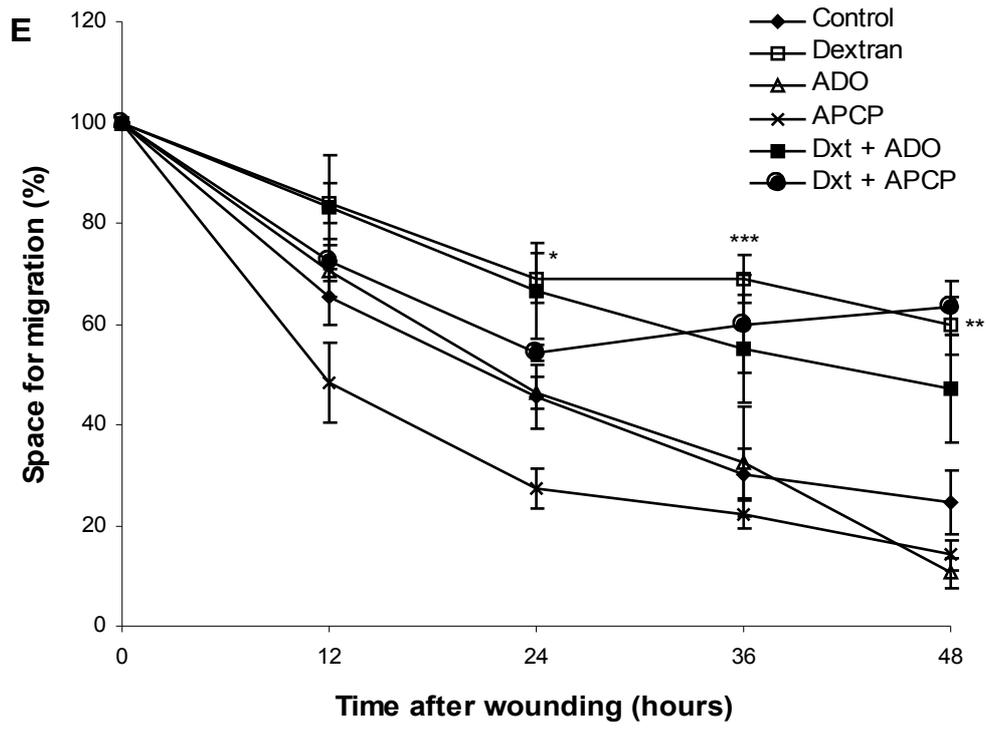


Figure 2







4. DISCUSSÃO

Gliomas são forma mais maligna de tumor do sistema nervoso central (DeAngelis, 2001), sendo caracterizados por seu crescimento amplamente difuso no tecido cerebral normal circundante, o que dificulta a ressecção cirúrgica (Chintala & Rao, 1996). Para invadir o tecido normal, as células tumorais primeiramente desprendem-se de seu local de origem, aderem-se à matriz extracelular e subseqüentemente liberam proteases específicas que degradam a matriz à qual se aderiu. Este processo sinaliza alterações morfológicas específicas que levam a célula a migrar, sendo este o último evento da via do processo de invasão (Nakada et al., 2006).

A ecto-5'-nucleotidase/CD73, é uma proteína ligada à membrana plasmática por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol. Ela catalisa a reação final de hidrólise do ATP, convertendo AMP à adenosina (Zimmermann, 1992; Zimmermann, 2000; Zimmermann, 2006). A ecto-5'-NT é também denominada CD73 devido a sua alta expressão na superfície celular de linfócitos B e T, constituindo um marcador de linfócitos maduros (Suderman, 1990). Outras funções são ainda atribuídas para esta molécula como a indução de vias de sinalização intracelular e mediação da adesão célula-célula e célula-matriz (Yegutkin, 2008).

Em modelos experimentais de lesão cerebral foi mostrado um aumento na expressão de algumas ectonucleotidases e também da ecto-5'-NT por astrócitos corticais e células da microglia. Foi sugerido que este aumento poderia estar associado a um comportamento de reparo ao tecido que sofrera o dano, principalmente pelo aumento de degradação do ATP, que em altas concentrações

é considerado citotóxico e também pelo aumento na produção de adenosina, via ação da ecto-5'-NT, que contribui enormemente em ações neuroprotetoras além de seu papel pró-angiogênico (Nadeljkovic et al., 2006; Braun et al., 1997). Curiosamente, células de glioma apresentam elevada atividade da ecto-5'-NT em comparação com os astrócitos (Wink et al, 2003b) Esta característica tem sido atribuída à função dessa enzima em produzir adenosina a qual para o tumor, serviria como estímulo para o crescimento celular e angiogênese, além de regular a liberação de citocinas e também por apresentar ação supressora às funções imunes direcionadas contra o tumor (Spychala, 2000). Outras funções foram também atribuídas para a alta presença da ecto-5'-NT/CD73 em gliomas, sendo o envolvimento na promoção da invasividade tumoral e ainda como uma molécula de adesão (Fenoglio et al., 1997).

No presente trabalho, alguns processos envolvidos na invasão dos gliomas foram investigados através do estudo do efeito de componentes da matriz extracelular (ECM) sobre parâmetros de proliferação, adesão e migração celular e também sobre a atividade da ecto-5'-nucleotidase. Além disso, investigamos o efeito do inibidor da ecto-5'-NT (APCP) e de seu produto, adenosina, sobre os mesmos parâmetros a fim de estabelecer uma possível relação entre essa enzima e os mecanismos de invasão dos gliomas. Nossos resultados mostraram que a ecto-5'-NT expressa pela linhagem de glioma humano U138-MG, teve sua atividade inibida, quando as células em cultura, foram tratadas com laminina, fibronectina/dextran e laminina/dextran, com um percentual inibitório de 33, 41 e 62 %, respectivamente. Foi descrito que a mesma enzima de células de glioblastoma de rato, Rugli-cells, foi inibida pela fibronectina e teve sua atividade aumentada na presença da laminina (Olmo et al., 1992). Estes resultados

contraditórios podem ser explicados pela diferente origem das células de glioma. A redução da atividade da ecto-5'-NT observada no co-tratamento fibronectina/dextran sulfato pode ser atribuída ao fato que glicoproteínas como a fibronectina e também a laminina, apresentam sítios de ligação para polissacarídeos sulfatados (Aguiar et al., 2005) e estas moléculas sulfatadas, como o dextran sulfato, por exemplo, são apresentadas como quelantes para cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} . Estudos realizados por Schetinger et al. (1998), mostraram que a atividade de ectonucleotidases e também da ecto-5'-NT em sinaptossomas de córtex cerebral de rato, foi reduzida quando na presença de heparina e dextran sulfato, corroborando assim com os dados aqui obtidos. Sadej et al., (2006) demonstrou em seu trabalho realizado com células de melanoma, que a ecto-5'-NT, é co-expressada com integrinas, proteínas estas que exercem a função de receptores para glicoproteínas. Esta afirmação nos leva a supor que a interação entre fibronectina ou laminina/dextran, pode estar fazendo com que o dextran mantenha-se próximo à membrana das células e este, por sua vez, quele íons Mg^{2+} , que em menor concentração no meio, leva a uma diminuição da atividade catalítica da enzima em questão por se tratar de seu íon cofator. A forte inibição da atividade da ecto-5'-NT, observada no tratamento laminina/dextran pode ser considerada como um efeito sinérgico de ambos os tratamentos.

Avaliando o efeito de glicoproteínas e glicosaminoglicanas, sozinhas ou em associação, nós observamos uma diminuição da proliferação celular na presença do dextran, 37% e ainda nos co-tratamentos colágeno tipo I/dextran (28%), colágeno tipo I/condroitina sulfato (40%) e laminina/dextran sulfato (29%). Estes resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Aguiar e colaboradores (2005) que demonstraram o efeito de glicosaminoglicanas e

glicoproteínas sobre a proliferação da linhagem de células de glioma de rato C6, onde nos co-tratamentos fibronectina/heparina ou fibronectina/condroitina sulfato, houve uma redução do potencial proliferativo dessas células. Contudo, no presente trabalho nós não observamos uma relação entre a inibição da enzima ecto-5'-nucleotidase e a inibição da proliferação celular, exceto no caso do co-tratamento laminina/dextran sulfato.

Outras características estudadas foram as propriedades adesivas das células de glioma em cultura. Os resultados mostraram que o tratamento com o APCP, um inibidor da ecto-5'-nucleotidase, gerou um forte efeito estimulatório enquanto a adenosina inibiu significativamente a adesão das células U138-MG. Estes resultados mostram uma importante influência da ecto-5'-nucleotidase na adesão das células de glioma através da produção de adenosina, que pela inibição deste comportamento nas células de glioma, pode estar envolvida no processo de invasibilidade destas células tumorais.

As glicoproteínas colágeno do tipo I e fibronectina não demonstraram efeito sobre a adesão das células de glioma. No entanto, elas previniram o efeito estimulatório causado pelo APCP. Considerando que as células foram pré-incubadas por 30 minutos com este inibidor antes do tratamento com as glicoproteínas, o efeito direto do APCP sobre a proteína ecto-5'-nucleotidase não pode ser excluído. Os efeitos obtidos na adesão celular na presença das glicoproteínas após o tratamento com APCP pode ser explicado pela co-expressão da ecto-5'-nucleotidase e diferentes integrinas, como mencionado anteriormente. As glicoproteínas ligadas a seus receptores, as integrinas, podem manter a atividade da ecto-5'-NT, produzindo adenosina e desta forma, reverter o efeito estimulatório do APCP.

A condroitina sulfato mostrou um efeito similar ao apresentado pelo APCP na adesão das células U138-MG, que foi revertido na presença da adenosina. Muitos estudos sugerem que proteoglicanas da superfície celular estão envolvidas no controle do crescimento das células de glioma, adesão e invasão. A condroitina sulfato é superexpressa em gliomas malignos *in vivo* sendo proposto o seu envolvimento na invasão do tecido cerebral sadio (Bellail et al.,2004). Assim como as integrinas, a CD44, uma molécula caracterizada como receptor de membrana para glicosaminoglicanas, também é co-expressada com a ecto-5'-NT/CD73 em células de melanoma. Isso pode explicar o efeito tão proeminente da condroitina sobre a adesão das células U138-MG, o qual pode ser devido à interação direta da chondroitina com a ecto-5'-NT no momento crucial da adesão celular, ou ainda pode ser via ligação ao seu receptor CD44 e este interagir com a ecto-5'-NT/CD73 reduzindo sua atividade e a conseqüente redução de adenosina, aumentar a adesão das células.

A linhagem de células U138-MG tiveram sua adesão e migração inibidas quando foi tratada com dextran sulfato. Esta glicosaminaglicana não é expressa no SNC, caracterizando a presença de um fator externo, ao qual as células não estão adaptadas. Diante disto, podemos sugerir que, embora o dextran sulfato não tenha afetado a atividade da ecto-5'-nucleotidase quando as células foram tratadas apenas com essa molécula, na presença de glicoproteínas existentes na matriz extracelular dos gliomas, ele reduziu a atividade da enzima. Além disso, quando sozinho, ele reduziu a proliferação celular, adesão e migração, indicando também que o dextran sulfato age como uma molécula inibidora da invasibilidade das células de glioma, por ativação de outras vias além da que é mediada pela ecto-5'-NT/CD73.

A laminina é uma glicoproteína envolvida no processo de invasibilidade tumoral. Sua distribuição no sistema nervoso central se dá em locais onde as células de glioma preferencialmente migram, como a membrana basal periférica dos vasos sanguíneos, membrana basal do espaço subpial, zona subependimal e ainda pelo plexo coróide (Chintala e Rao, 1996; Goldbrunner et al., 1999; Bellail et al., 2004). Tais locais são evidenciados por constituírem a barreira hematoencefálica que impede a livre circulação de moléculas entre o SNC e a corrente sanguínea sistêmica. Sabendo-se que gliomas raramente formam metástases, podemos, com base nos resultados obtidos aqui, sugerir uma hipótese que envolve o sistema purinérgico para explicar tal comportamento. No momento em que a célula de glioma entra em contato com a membrana basal dos vasos sanguíneos, por exemplo, ela tem a atividade da ecto-5'-NT/CD73 inibida pela presença, principalmente de laminina, ocasionando uma diminuição na produção de adenosina. Diante do contato com as moléculas da MEC presentes na membrana basal, vias migratórias podem então ser ativadas fazendo com que a célula aumente seu potencial invasivo pelo cérebro normal, porém algumas das células, podem vir a sofrer diapedese e invadir o lúmen do vaso sanguíneo. No entanto, a ausência da adenosina via inibição da ecto-5'-NT/CD73 pela laminina, permitiria que a célula do glioma na corrente sanguínea, sofresse ataque do sistema imune, impedindo assim o alastramento do tumor pelo organismo via corrente sistêmica. Mesmo diante das evidências permitirem chegar a esta conclusão, mais experimentos são necessários para comprovar esta teoria bem como a forma de interação entre essas moléculas que precisa ainda ser melhor estudada.

Já no processo invasivo exercido por unidades celulares dos gliomas, que invadem sozinhas o parênquima cerebral sadio, podemos demonstrar um possível envolvimento da ecto-5'-NT/CD73, frente ao efeito evidenciado diante ao tratamento com condroitina sulfato. Esta glicosaminoglicana é amplamente expressa pelas células do parênquima cerebral sadio e está amplamente envolvida no processo de invasibilidade das células tumorais no cérebro (Bellail et al., 2004). Ao contrário do efeito demonstrado pela laminina, a condroitina aumenta amplamente a adesão celular e seu efeito é revertido pela presença da adenosina, o que pode vir a confirmar o envolvimento da ecto-5'-NT/CD73 com esta proteoglicana, aumentando o potencial invasivo das células de glioma no tecido cerebral normal.

Com base nos resultados aqui apresentados, podemos sugerir que existem possíveis interações entre a ecto 5'-nucleotidase/CD73 expressa pela linhagem de célula de glioma humano U138-MG e componentes da matriz extracelular, sendo estas glicoproteínas ou glicosaminoglicanas. Tais interações apresentam efeitos opostos aos evidenciados em células de tumores sistêmicos, o que vem somar à hipótese de que o perfil de agressividade dos gliomas está adaptado ao microambiente local específico, encontrado no sistema nervoso central. Nossos resultados ainda mostram que o padrão de expressão da ecto-5'-NT/CD73 pelos gliomas deve ser devido ao fato de que esta molécula e seu produto, adenosina, estão intimamente envolvidos nas características altamente invasivas demonstradas pelos gliomas.

5. CONCLUSÕES

- 1) A ecto-5'-nucleotidase das células de glioma humano U138-MG teve sua atividade diminuída na presença de componentes da matriz extracelular;
- 2) A proliferação celular da linhagem estudada diminuiu diante do tratamento com algumas moléculas da matriz extracelular, no entanto esse efeito não foi relacionado com redução da atividade da enzima de estudo;
- 3) O APCP ativou fortemente a adesão das células de glioma enquanto que a adenosina inibiu significativamente;
- 4) As três glicoproteínas testadas reverteram o efeito do APCP no evento de adesão celular, porém sozinhas, apenas a laminina apresentou um efeito inibitório sobre tal comportamento;
- 5) A condroitina sulfato ativou a adesão celular em níveis semelhantes ao APCP e na presença da adenosina seu efeito foi revertido;
- 6) O dextran sulfato, quando sozinho como tratamento, inibiu os eventos de proliferação, adesão e migração celular;

6. PERSPECTIVAS

- 1) Estudar o efeito da adenosina e do AMP em co-tratamento com as matrizes que apresentaram efeito sobre a atividade da ecto-5'-nucleotidase e sobre a proliferação celular;
- 2) Realizar experimentos de avaliação da atividade enzimática elevando a concentração do seu íon cofator, o Mg^{2+} , após o tratamento das células U138MG com as glicosaminoglicanas que reduziram a atividade da ecto-5'-NT/CD73, a fim de confirmar a hipótese sugerida para tal efeito obtido;
- 3) Avaliar os efeitos dos tratamentos utilizados sobre o potencial invasivo das células de glioma humano U138-MG com o uso de um protocolo específico para este fim;
- 4) Avaliar o estágio do ciclo celular das células de glioma após o tratamento com dextran sulfato, a fim de se evidenciar seu efeito sobre essas células e ainda o efeito citotóxico desta molécula sobre cultura primária de astrócitos;
- 5) Avaliar o efeito destes componentes da matriz extracelular sobre diferentes eventos celulares em linhagens de glioma que apresentam a ecto-5'-nucleotidase silenciada;

7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO

Bavaresco L, **Cappellari A C**, Bernardi A, Braganhol E, Rockenbach L, Farias P F, Wink MR, Cañedo A D, Battastini A M O. THE ROLE OF ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 ON CELL PROLIFERATION OF GLIOMA CELL LINES.

Artigo submetido à revista Molecular and Cellular Biochemistry.

8. REFERÊNCIAS

AGUIAR C B M, GARCEZ, R C, ALVAREZ-SILVA M, TRENTIN, A G. Undersulfation of proteoglicans and proteins alter C6 glioma cells proliferation, adhesion and extracellular matrix organization. *Int J Develop Neuroci.* 20:563-571, 2002.

AGUIAR C B M, LOBÃO-SOARES, B , ALVAREZ-SILVA M, TRENTIN, A G. Glycosaminoglicans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell proliferation and cell migration. *BMC Cell Biol.* 6:31, 2005

BELLAIL, A C, HUNTER, S B, BRAT, D J, TAN, C, MEIR, E G V. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:1046-1069, 2004.

BOROWIEC A, LECHWARD, K, TKACZ-STACHOWSKA, K, SKTADANOWSKI, A C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochem Polonica.* 53(2):269-278, 2006.

BRAUM, N, LENZ, C, GILLARDON, F, ZIMMERMANN, M, ZIMMERMANN, H. Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase. *Brain Res.* 766:213-226, 1997.

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

CHINTALA, S K, RAO, J S. Invasion of human glioma: role of extracellular matrix proteins. *Front Biosci* 1:324-39, 1996.

CHINTALA S K, TONN, J C, RAO, J S. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int J Develop Neurosci.* 14:495-502, 1999.

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

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

DIECKHOFF, J, MOLLENHAUER, J, KÜHL, U, NIGGEMEYER, B, MARK, K V D, MANNHERZ. The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin modify the AMPase activity of 5'-nucleotidase from chicken gizzard smooth muscle. *Fed Europ Biochem Soc* 195: 82-86, 1985.

DONNELLY-ROBERTS, D, MCGARAUGHTY, S, SHIEH, C C, HONORE, P, JARVIS, M F. Painful purinergic receptors. *Perspectiv in Pharmacol.* 324(2): 409-415, 2007.

DUARTE, F, PETTELLA J E H, ÁVILA, C M. In: filho GB. et al. *Bogliolo patologia.* 5 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 723-825, 1994.

FIELDS, R D, STEVENS B. ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci.* 23:625-633, 2000.

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

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

FRANCO-HERNÁNDEZ, C, MARTINEZ-GLEY, V, REY, J A. Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirur.* 18:373-382, 2007.

GIROLAMI, V *et al.* O sistema nervoso central. in Cotran R S, Kumar V, Collins. Robbins Patología estructural e funcional. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

GOLDBRUNNER R H, BERNSTEIN J J, TONN J C. Cell-Extracellular matrix interaction in glioma invasion. *Acta Neurochir.* 141:295-305, 1999.

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 G₀-G₁ cell cycle entry. *PNAS.* 103(1):111-116, 2006.

HE, F, SUN, Y E. Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol.* 39:661-665, 2007.

KLEIHUES P, OHGAKI H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *J Neuro-Oncol.* 1:44-51, 1999.

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

MEHUL B, DOYENNETTE-MOYNE M-A, AUBERY M, CODOGNO P, MANNHERZ H G. Enzymatic activity and *in vivo* distribution of 5'-nucleotidase, an extracellular matrix binding glycoprotein, during the development of chicken striated muscle. *Exp Cell Res*. 203: 62-71, 1992.

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

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, 2006.

NEDELJKOVIC N, BJELOBABA I, SUBASIC S, LAVRNJA I, PEKOVIC S, STOJKOV D, VJESTICA A, RAVIC, STOJILJKOVIC M. Up-regulation of ectonucleotidase activity after cortical stab injury in rats. *Cell Biol Int*. 30:541-546, 2006.

NORTH, R A, VERKHRATSKY, A. Purinergic transmission in the central nervous system. *Eur J Physiol*. 452:479-485, 2006.

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

NOZAKI, M, TADA, M, KOBAYASHI, H, ZHANG, C L, SAWAMURA, Y, ABE, H, ISHII, N, MEIR, E G V. Roles of the functional loss of *p53* and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *J Neuro-Oncol.* 124-137, 1999.

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

OHGAKI, H, KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American J Pathol.* 170:1445-1453, 2007.

OLMO N, TURNAY J, RISSE G, DEUTZMANN R, MARK K, LIZARBE M A. Modulation of 5'-nucleotidase activity in plasma membranes and intact cells by the extracellular matrix proteins laminin and fibronectin. *Biochem J* 282:181-188, 1992.

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

QUIGLEY, M R, POST, C, EHRLICH, G. Some speculation on the origin of glioblastoma. *Neurosurg Rev.* 30:16-21, 2007.

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

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

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

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.

SCHETINGER M R C, FALQUEMBACH F, MICHELOT F, MEZZOMO A, ROCHA T. Heparin modulates adenine nucleotide hydrolysis by synaptosomes from cerebral cortex. *Neurochem Int.* 33:243-249, 1998.

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.

SOBEIH, M M, CORFAS, G. Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system. *Int J Develop Neurosci.* 20:349-357, 2002.

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

STOCHAJ, U, RICHTER, H, MANNHERZ, H G. Chicken gizzard 5'-nucleotidase is a receptor for the extracellular matrix component fibronectin. *Eur J Cell Biol.* 51:335-338, 1989.

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

TYSNES B B, MAHESPARAN R, THORSEN F, HAUGLAND H K, PORWOL T, ENGER P O, LUND-JOHANSEN M, BJERKVIG R. Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas. *Int J Develop Neurosci* 17:531-539, 1999.

WINK M.R., BRAGANHOL E., TAMAJUSUKU A.S.K., EMERSON, A C, KARL, J, BARRETO-CHAVES, M L, SARKIS, J.J.F., BATTASTINI A.M.O. Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem Int.* 43:621-628, 2003a.

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

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

ZAMECNIK, J, VARGOVA, L, HOMOLA, A, KODET, R, SYKOVA, E. Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neurophatol Appl Neurobiol.* 30:338-350, 2003.

ZHOU P., ZHI X., ZHOU, P, CHEN, S, ZHAO, F, SHAO, Z, OU, Z, YIN, L. Effects os ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Rep.* 17:1341-1346, 2007a.

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

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

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

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

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