

INVESTIGAÇÃO DA ECTO-5'NUCLEOTIDASE COMO ALVO TERAPÊUTICO EM GLIOMAS

FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA¹; JULIANA H. AZAMBUJA², CARLUS AUGUSTU T. DO COUTO², PRISCILA T. RAMOS², ROSÉLIA M. SPANEVELLO², ELIZANDRA BRAGANHOL³

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – fe.t@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

³Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – elizbraganhol@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Os tumores cerebrais primários são um conjunto de neoplasias malignas originárias de células de sustentação do tecido nervoso. Os Gliomas são tumores originados de células da glia e estão entre as mais importantes neoplasias sólidas do Sistema Nervoso Central (SNC). São caracterizados por ampla heterogeneidade histológica e clínica. Atualmente, segundo a OMS, a classificação desses tumores é baseada no tipo celular, na localização do tumor e no grau de malignidade (LOUIS, 2007).

A evolução dos gliomas está relacionada a múltiplas alterações em vias que controlam o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular (HOLLAND, 2001). Estudos recentes indicam que alterações na sinalização purinérgica também participam da progressão tumoral (BRAGANHOL, 2009). Apesar de serem atribuídas aos nucleotídeos ações estritamente intracelulares como fornecimento de energia para processos intracelulares como transporte ativo, motilidade celular e biossíntese, atualmente está estabelecido o conceito de que essas moléculas também atuam como mensageiros extracelulares (BURNSTOCK, 1972). O conceito de neurotransmissão purinérgica surgiu em 1972 quando Burnstock demonstrou em seu experimento que o ATP (adenosina trifosfato) extracelular foi responsável pela neurotransmissão não adrenérgica – não colinérgica (NANC). Assim, o ATP foi proposto como um transmissor simpático e parasimpático e atualmente sabe-se que este atua como sinalizador no SNC e Periférico via ativação de receptores específicos, os purinoreceptores (BURNSTOCK 2009, 2012). Segundo Burnstock (2008), os nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular podem ainda regular funções patofisiológicas em diversos tecidos, incluindo doenças inflamatórias, neurodegenerativas, doenças vasculares e câncer.

As ectonucleotidases compreendem um grupo de enzimas que apresentam o sítio catalítico voltado para o meio extracelular e que estão envolvidas na degradação de nucleotídeos e na formação de nucleosídeos, possuindo, portanto um papel chave na regulação da sinalização purinérgica (ROBSON, 2006). Uma vez liberado para o meio extracelular, o ATP pode ser hidrolizado a ADP e posteriormente a AMP por uma família de ectonucleotidases denominada de Ectonucleosídeo-trifosfodifosfo-hidrolases (ENTPDases). O AMP formado é o substrato para a enzima marca-passo da rota, a Ecto-5'nucleotidase/CD73 (5'NT/CD73).

A 5'NT/CD73 é uma enzima ancorada a membrana plasmática por um resíduo glicosil-fosfatidil-inositol sendo amplamente expressa em linfócitos, células endoteliais e epiteliais (ZIMMERMANN, 1992). Evidências sugerem que alterações na sinalização purinérgica estão envolvidas na progressão do câncer, pois gliomas apresentam alterações na via de metabolização de nucleotídeos extracelulares. A 5'NT/CD73 possui uma importante função catalítica, de realizar a conversão de AMP em adenosina. Também está envolvida em interações célula-célula e célula-matriz sendo considerada, portanto, uma molécula de adesão que contribui para formação de tumores sólidos (FASTBOM, 1987; VOGEL, 1991). A expressão da 5'NT/CD73 se encontra elevada em tumores sólidos, colaborando para processos de neovascularização, migração e invasão (SPYCHALA, 2000).

Como agentes efetivos ainda não estão disponíveis na terapêutica de gliomas, entendemos que esta enzima pode ser considerada um novo alvo terapêutico. Portanto, o objetivo do nosso trabalho é avaliar a atividade da 5'NT/CD73 em linhagem de glioma, comparando com as células análogas normais, os astrócitos, e investigar o potencial de agentes inibidores da 5'NT/CD73, como o α,β -metileno-ADP (AMPCP), na terapia antiglioma.

2. METODOLOGIA

Ensaio enzimático: A atividade AMPásica foi avaliada em linhagem de glioma C6 e em astrócitos utilizando AMP (2 mM) como substrato utilizando o método do verde de malaquita (Chan et al, 1986). A atividade foi expressa como μmol de Pi liberado/min/mg de proteína utilizando uma curva padrão de KH_2PO_4 .

Ensaio de proliferação celular: As células C6 de glioma de rato foram semeadas em placas de 24 poços (2×10^4 células/poço) e expostas a concentrações crescentes de AMPCP (1, 10, 100 μM). Após 48h de tratamento, a atividade AMPásica e a proliferação celular foram avaliadas pelo método do verde de malaquita e contagem de células em câmara de newbauer, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da atividade da 5'NT/CD73 indicou um aumento de 7 vezes da hidrólise de AMP em glioma C6 quando comparado com as células normais, os astrócitos. O tratamento AMPCP (1, 10, 100 μM) promoveu uma diminuição de 1,8, 2,0 and 1,7 vezes da proliferação das células C6, o qual foi seguido por uma diminuição paralela de 2,0, 2,15 e 3,5 vezes da atividade AMPásica quando comparado com as células controle.

Esses resultados sugerem que o aumento da expressão da 5'NT/CD73 está associado ao processo de progressão tumoral e a inibição da sua atividade pelo tratamento com AMPCP resulta em diminuição da proliferação celular.

Tabela 1. Análise do efeito do tratamento com AMPCP, inibidor da 5'NT/CD73, sobre a proliferação celular e sobre a hidrólise de AMP em linhagem de glioma C6.

| Tratamento | Controle | AMPCP 1 μ M | AMPCP 10 μ M | AMPCP 100 μ M |
|-------------------------|--|---|---|---|
| Proliferação | 100% | 75% | 70% | 71% |
| Hidrólise de AMP | | | | |
| | 0,08 μ mol Pi/ min/ mg de proteína | 0,018 μ mol Pi/ min/ mg de proteína | 0,029 μ mol Pi/ min/ mg de proteína | 0,009 μ mol Pi/ min/ mg de proteína |

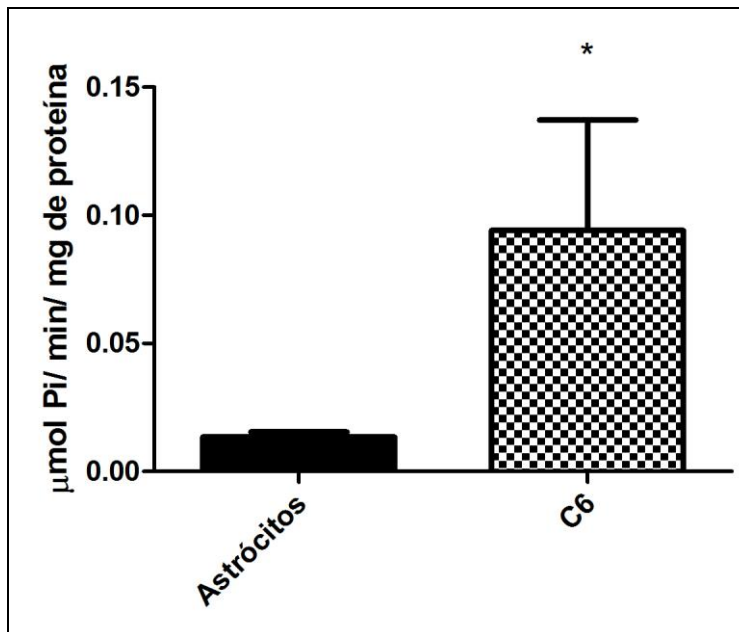


Figura 1. Atividade AMPásica em cultura primária de Astrócitos e linhagem de glioma C6. Resultados expressos como média \pm DP. N=3. * Significativamente diferente dos astrócitos ($p < 0,05$) segundo Teste t de Student.

4. CONCLUSÕES

Portanto, estes resultados reforçam a importância de 5'NT/CD73 como um fator determinante na progressão dos gliomas. Além disso, os dados fornecem evidências que estratégias que visam a inibição da expressão e/ou atividade da 5'NT/CD73 podem ser úteis para aplicações terapêuticas clínicas e experimentais de tumores sólidos.

Apoio: Capes, CNPq, FAPERGS, FIPE/HCPA

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LOUIS, D.N., OHGAKI, H., WIESTLER, O.D., CAVENEE, W. K., BURGER, P.C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B.W., KLEIHUES, P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathology**. 114(2): 97–109. 2007.

HOLLAND, E.C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nature Review Genetics**. NY.2(2):120-9. 2001.

BRAGANHOL, E., MORRONE, F.B., BERNARDI, A., HUPPES, D., MEURER, L., EDELWEISS, M.I., LENZ, G., WINK, M.R., ROBSON, S.C., BATTASTINI, A.M. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. **Cancer Science**. 100(8):1434-42, 2009.

SPYCHALLA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology Therapy**. USA. 87:161-173. 2000.

FASTBOM, J., PAZOS, A., PALACIOS, J.M. The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. **Neuroscience**. Suíça. 22(3):813-26. 1987.

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

ZIMMERMANN, H. **Biochemistry Journal**. Alemanha.15;285 (Pt 2):345-65. 1992.

BURNSTOCK G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Review Drug Discovery**. Londres. 7(7):575-90. 2008.

BURNSTOCK G. Purinergic nerves. **Pharmacology Review**. Londres 24: 509–581. 1972.

BURNSTOCK G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. **Bioessays**. Londres. 34: 218–225. 2012.

BURNSTOCK G. Purinergic signalling: past, present and future. **Brazilian Journal Of Medicine and Biological Research**. Brazil. 42: 3-8. 2009.

ROBSON, S.C., SÉVIGNY, J., ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**. USA. 2:409–430. 2006.