

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO INIBIDOR DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73, $\alpha,\beta$ -metileno-ADP, PARA O TRATAMENTO DE GLIOMAS**

**PRISCILA TREPTOW RAMOS<sup>1</sup>; FERNANDA C. TEIXEIRA<sup>1</sup>; JULIANA H. AZAMBUJA<sup>1</sup>; FÁTIMA T. A. BEIRA<sup>2</sup>; ROSÉLIA M. SPANEVELLO<sup>1</sup>; ELIZANDRA BRAGANHOL<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos; Universidade Federal de Pelotas – [priscila.treptow@hotmail.com](mailto:priscila.treptow@hotmail.com)*

<sup>2</sup>*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, IB; Universidade Federal de Pelotas*

<sup>3</sup>*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos Universidade Federal de Pelotas – [elizbraganhol@yahoo.com.br](mailto:elizbraganhol@yahoo.com.br)*

### 1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral caracterizado pelo elevado grau de proliferação e invasão, o que constitui em uma das principais causas de falência do tratamento e de elevadas taxas de mortalidade (HOLLAND, E. 2001). Assim, agentes efetivos ainda não são disponíveis, tornando necessária a caracterização de novos alvos biológicos que possam interferir no crescimento do GBM, proporcionando novas alternativas terapêuticas para os pacientes.

Alterações na sinalização purinérgica tem sido relacionadas a diversas patologias, incluindo o câncer. Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, como o ATP e a adenosina, atuam como mensageiros capazes de sinalizar uma variedade de efeitos, incluindo proliferação, morte, migração, diferenciação celular e resposta imune. Os efeitos biológicos dessas moléculas são exercidos por meio da ativação de receptores purinérgicos denominados de P2 e P1 e controlados por ectoenzimas que catalisam a sua interconversão (BURNSTOCK G, 2012). Essas enzimas denominadas de ectonucleotidases incluem as ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases (E-NTPDases) e a ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73). As E-NTPDases atuam hidrolisando nucleosídeos tri e difosfato até os respectivos nucleosídeos monofosfato (ATP→AMP). O AMP é então hidrolisado até adenosina pela ecto-5'-NT/CD73 (ROBSON S.C. et al, 2006).

Nesse contexto, a enzima e proteína de adesão ecto-5'-nucleotidase/CD73 (5'-NT/CD73) tem emergido como um novo alvo na terapia antitumoral. O aumento da expressão da ecto-5'-NT/CD73 em diferentes tipos de tumores, incluindo o GBM, está relacionado a processos de suporte ao crescimento tumoral e a formação de metástases (STAGG, J. et al, 2011). Além disso, a ecto-5'-NT/CD73 é a principal fonte enzimática de adenosina extracelular, a qual modula eventos de proliferação celular, angiogênese e protege os tumores do ataque imune.

Assim, esse trabalho de pesquisa propõe a utilização da ecto-5'-NT/CD73 como um novo alvo terapêutico para o tratamento dos gliomas.

### 2. METODOLOGIA

Cultivo da linhagem de glioma C6: A linhagem celular de glioma C6 foi obtida da ATCC e foi cultivada em meio de cultura DMEM suplementado com 5% de

soro fetal bovino (SFB) em incubadora de células em atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Tratamento das culturas com AMPCP ( $\alpha,\beta$ -metileno-ADP: As células de glioma C6 foram semeadas em placas de 24 poços (20x10<sup>3</sup> células/poço). Após 24 h do semeio, as células foram tratadas por 48 h com AMPCP nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ M.

Avaliação da proliferação celular: Ao final do tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e a proliferação celular foi avaliada por contagem em câmara de newbauer. Os resultados foram expressos como percentual (%) de células com relação ao controle (100%).

Ensaio enzimático: Ao final do tratamento com AMPCP, a atividade AMPásica foi avaliada em linhagem de glioma C6 utilizando AMP (2 mM) como substrato utilizando o método do verde de malaquita (CHAN et al, 1986). A atividade foi expressa como  $\mu$ mol de Pi liberado/min/mg de proteína utilizando uma curva padrão de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Análise estatística: os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram analisados por teste de análise de variância (ANOVA) seguido de post-hoc de Tukey. Os dados foram considerados significativamente diferentes do controle para um  $P \leq 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o tratamento com AMPCP por 48 h, verificou-se que nas concentrações de 10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M ocorreu uma diminuição na proliferação celular de glioma C6 conforme observado na Figura 1, isto acontece provavelmente porque o AMPCP é um inibidor específico da enzima 5'-nucleotidase, uma enzima que hidrolisa o AMP até adenosina. A inibição da enzima pelo AMPCP foi confirmada em experimento realizado em paralelo, conforme apresentado na Figura 2. Assim, a inibição dessa enzima pode resultar na diminuição da disponibilidade de adenosina no meio extracelular, molécula que apresenta um leque de funções pró-tumorais, incluindo imunossupressão, angiogênese e indução da proliferação celular.

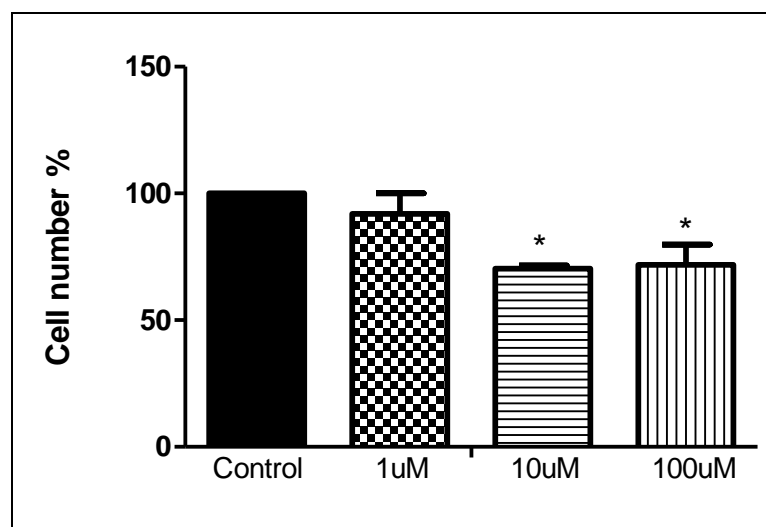


Figura 1. Análise da proliferação celular da linhagem de glioma de rato C6, após o tratamento por 48 h com o inibidor seletivo da ecto-5'-nucleotidase/CD73 AMPCP. Dados expressos percentual (%) em relação ao controle (100%).

\* Significativamente diferente do controle ( $p < 0,05$ ).

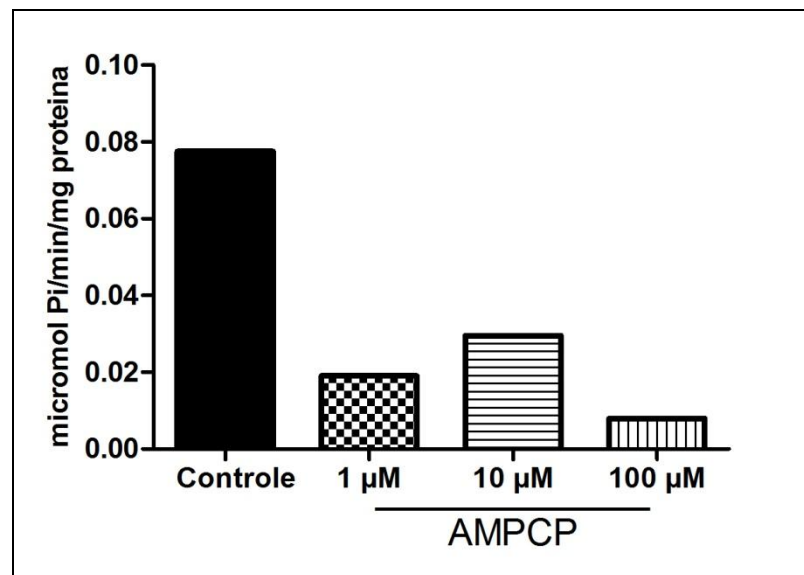


Figura 2. Análise do efeito do tratamento com AMPCP, inibidor da 5'NT/CD73, sobre a hidrólise de AMP em linhagem de glioma C6. Dados expressos em  $\mu\text{mol Pi/min/MG}$  de proteína.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos somados aos dados da literatura indicam que a ecto-5'-nucleotidase constitui um alvo interessante para a terapia anti-glioma, uma vez que o tratamento com o inibidor seletivo dessa enzima, o AMPCP, foi capaz em diminuir a proliferação celular de glioma C6.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUMCROT D. et al., RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. **Nature Chemical Biology**, v.2, p.711-719, 2006.

BURNSTOCK G., Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. **Bioessays**, v.34, n.3, p. 218-225, 2012.

HOLLAND, E., Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nature Reviews Genetics**, Nova York, v.2, p. 120-129, 2001.

ROBSPN S.C. et al., The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Springer**, v.2, p.409-430, 2006.

STAGG, J. et al., CD73-Deficient Mice Have Increased Antitumor Immunity and Are Resistant to Experimental Metastasis. **Cancer Research**, v. 71, p. 2892–2900, 2011.

CHAN K.M., DELFERT D., JUNGER K.D. A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$  + stimulated ATPase activity. **Anal Biochem**, v.157, p. 375–380, 1986.