



Universidade Federal de Pelotas
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de
Alimentos Programa de Pós-graduação em
Bioquímica e Bioprospecção

Dissertação de Mestrado

**INVESTIGAÇÃO DA ECTO-5'NUCLEOTIDASE/CD73 COMO ALVO
TERAPÊUTICO EM GLIOMAS**

Fernanda Cardoso Teixeira

Pelotas, 2014

Fernanda Cardoso Teixeira

**INVESTIGAÇÃO DA ECTO-5'NUCLEOTIDASE/CD73 COMO ALVO
TERAPÊUTICO EM GLIOMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre Ciências (área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Profa. Dra. Elizandra Braganhol

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosélia M. Spanevello

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

T266i Teixeira, Fernanda Cardoso
Investigação da ecto-5'nucleotidase/cd73 como alvo terapêutico em gliomas / Fernanda Cardoso Teixeira. – 79f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2014. – Orientador Elizandra Braganhol ; co-orientador Rose-
lia Spanevello.

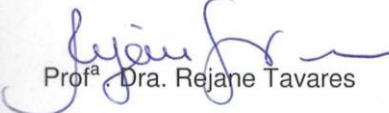
1.Glioma. 2.Ecto-5'-NT/CD73. 3.RNA de interferência.
4.Nanoemulsão. I.Braganhol, Elizandra. II.Spanevello, Rose-
lia. III.Título.

CDD: 572

Banca Examinadora:


Prof^a. Dra. Elizandra Braganhol


Prof^a. Dra. Francieli Moro Stefanello


Prof^a. Dra. Rejane Tavares

Prof^a. Dra. Giovana Gamaro (Suplente)

Dedico

As pessoas especiais da minha vida,
Marli e José Cláudio.

Agradecimentos

Agradeço a minha querida orientadora Eliz por ter me estendido à mão num momento de incerteza e ter me acolhido de forma tão carinhosa. Pela confiança em mim depositada para realizar um trabalho tão especial. Por ser um exemplo de pessoa e de profissional que tive o grande prazer de conviver nesses dois anos do mestrado. Por me motivar nos momentos em que tivemos dificuldades e com um sorriso mostrar que sempre temos que acreditar que nosso trabalho renderá bons frutos. Por me contagiar com sua paixão pela ciência, enfim por tudo!

À minha co-orientadora Rose por estar sempre disposta a ajudar, escutar, resolver questões, contribuir cientificamente e pelo exemplo de determinação.

Ao Prof. Dr. Helder Teixeira e a Dr^a Fernanda Bruxel, pela parceria firmada. Por me receberem tão bem em seu laboratório e pelo preparo e caracterização das nanoemulsões utilizadas neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade De Veterinária, na pessoa do Prof. Dr. Rafael Mondedoro pela disposição em ajudar e por ceder espaço em seu laboratório para que pudéssemos realizar algumas análises importantes para execução deste trabalho.

Ao pessoal do nosso grupo de pesquisa NEUROCAN por contribuir para realização dos meus experimentos, em especial a todos do laboratório de cultura celular.

A minha bolsista de iniciação científica Juliana, que foi meu braço direito na realização dessa dissertação. Sempre presente, disposta a ajudar, responsável e comprometida com nosso trabalho. Com toda certeza tua ajuda foi imprescindível e a tua amizade um grande presente.

A Elita, pela grande parceria que construímos. Pelo companheirismo nas horas boas e ruins. Pelas discussões científicas e também as não tão científicas. Teu apoio foi fundamental.

A Gabi, pela amizade sincera. Pelas viagens, congressos, planejamentos, festas, compras e também muito trabalho (principalmente nos finais de semana!).

A UFPEL pela oportunidade de realizar minha pós-graduação e me aperfeiçoar como profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção que contribuíram com a minha formação neste período. Aos funcionários do PPGBBIO e laboratoristas do CCQFA que sempre foram dispostos e solícitos para com a minha pessoa.

A CAPES, que pelo período de 24 meses me proporcionou apoio financeiro.

A todos meus amigos do coração que sempre me apoiaram, compreenderam minhas ausências, escutaram minhas alegrias e tristezas durante a realização dos experimentos e com um abraço sincero reforçaram minha certeza que este era o caminho que eu queria trilhar.

Por fim, para quem dedico essa dissertação, aos meus pais. Por acreditar no meu potencial e me fazerem acreditar nele. Por desde sempre me ensinarem o valor do estudo e da dedicação. Pela pessoa que me tornei, graças ao amor e educação que tive. Por estarem sempre presentes e me apoiando mesmo muitas vezes não compreendendo minhas escolhas. Vocês merecem um agradecimento mais que especial e saber que todas as minhas conquistas, são na verdade nossas!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Resumo

TEIXEIRA, Fernanda Cardoso. **Investigação da Ecto-5'nucleotidase/CD73 como alvo terapêutico em gliomas**. 2014, Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospeção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os gliomas são tumores que apresentam características fenotípicas e gênicas de células da glia. A ecto5'nucleotidase/CD73 (5'-NT/CD73) é considerada enzima marca-passo do sistema purinérgico responsável pela hidrólise de AMP em adenosina e apresenta expressão aumentada em tumores sólidos. Estudos de silenciamento da expressão gênica utilizando a ferramenta de RNA de interferência (siRNA) têm sido propostos como novas alternativas terapêuticas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de inibidores da atividade enzimática e da expressão da 5'-NT/CD73 como alvo terapêutico em gliomas. Para avaliar o efeito do inibidor AMPCP (adenosina 5'-(α,β -metileno) difosfato) sobre a proliferação celular foi utilizado o método de contagem celular e para determinar a hidrólise de AMP em células C6 foi utilizado o método do verde de malaquita. Para a realização do silenciamento da expressão gênica, duas sequências de RNA de interferência inéditas para a 5'-NT/CD73 foram desenhadas e nanoemulsões (NE) foram utilizadas como carreadoras. A citotoxicidade da NE em cultura primária de astrócitos e em linhagem celular de glioma C6 foi determinada pelo método do MTT. Para caracterizar as propriedades físico-químicas do complexo formado pela NE e siRNA-CD73 foram analisados parâmetros de tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão utilizando o aparelho Zetasizer e imagens da complexação entre NE e siRNA foram captadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A eficiência do silenciamento promovida pela transfecção dos complexos NE-siRNA-CD73 em glioma C6 foi determinada pela avaliação da atividade AMPásica e pela análise da expressão da 5'-NT/CD73 por imunocitoquímica e por citometria de fluxo utilizando anticorpo específico. A avaliação do efeito antiproliferativo dos complexos NE-siRNA-CD73 em glioma C6 foi realizada por MTT. Os resultados obtidos nessa dissertação estão de acordo com a hipótese do trabalho, onde o AMPCP reduziu a proliferação celular de glioma C6 a qual foi acompanhada pela inibição da hidrólise de AMP. As sequências de siRNA-CD73 foram eficientes em promover o silenciamento da 5'NT/CD73 e a formulação da NE também mostrou boa capacidade de complexação com os oligonucleotídeos, apresentando baixa toxicidade em células normais e seletividade para células tumorais. Observou-se que o complexo NE-siRNA-CD73 foi eficaz para silenciar a enzima e para reduzir a atividade AMPase e a viabilidade glioma C6. É importante notar que o sistema nanoestruturado (NE) foi eficaz tanto em complexar com oligonucleotídeos como para entrega-los nas células-alvo. No entanto, existe uma necessidade de novos estudos para compreender o efeito do tratamento do complexo NE-CD73-siRNA sobre o crescimento do tumor *in vivo*. Por fim, os nossos dados indicam a primeira vez que o potencial de siRNA-CD73 nanoemulsão carregada como uma alternativa terapêutica para o tratamento de GBM. Apesar disso há necessidade de estudos adicionais para compreender o efeito do tratamento dos complexos NE-siRNA-CD73 sobre o crescimento tumoral *in vivo*.

Palavras Chave: glioma; ecto-5'-NT/CD73; RNA de interferência; nanoemulsão.

Abstract

TEIXEIRA, Fernanda Cardoso. **Investigation of Ecto-5'nucleotidase/CD73 as therapeutic target in gliomas.** 2014. Thesis (MA) - Graduate Program in Biochemistry and Bioprospeção. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Gliomas are tumors that have genetic and phenotypic characteristics of glial cells. The ecto5'-nucleotidase/CD73 (5'-NT/CD73) enzyme is considered the limiting step of the purinergic system responsible for the hydrolysis of AMP to adenosine and shows increased expression in solid tumors. Studies silencing the gene expression using RNA interference tool (siRNA) have been proposed as new therapeutic alternative. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of inhibitors of the enzymatic activity and expression of 5'-NT/CD73 as a therapeutic target in gliomas. To evaluate the effect of inhibitor AMPCP (adenosine 5'-(α , β -methylene) diphosphate) on cell proliferation was used cell counting method and AMP hydrolysis in C6 cells was evaluated by malachite green method. To perform the silencing of gene expression, two new sequences of RNA interference for 5'-NT/CD73 were designed and nanoemulsions (NE) were used as carriers. Cytotoxicity of NE in primary astrocyte cultures and C6 glioma cell line was determined by MTT 3(4, 5-dimethyl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide) method. To characterize the physicochemical properties of the complex formed by NE and siRNA-CD73 parameters of particle size, zeta potential and polydispersity index using the Zetasizer apparatus and images of NE-siRNA complexes were captured and analyzed by transmission electron microscopy (TEM). The efficiency of silencing complexes promoted by transfection of NE-siRNA in C6 glioma was determined by evaluating the AMPase activity and expression analysis of 5'-NT/CD73 by immunocytochemistry and flow cytometry using specific antibody. The assessment of the antiproliferative effect of the complexes NE-siRNA in C6 glioma was performed by MTT. The results of this work are consistent with the hypothesis that AMPCP reduced cell proliferation of C6 glioma which was followed by the inhibition of AMP hydrolysis. The sequences of siRNA were effective in promoting 5'NT/CD73 silencing and NE formulation showed good complexing ability with the oligonucleotide, with low toxicity in normal cells and selectivity for tumor cells. It was observed that the NE-CD73-siRNA complex was effective to silence the enzyme and reduce AMPase activity and viability of C6 glioma. It is important to note that the nanostructured system (NE) was effective both in complex with oligonucleotides as them for delivery into target cells. However, there is a need for further studies to understand the effect of treatment of NE-CD73-siRNA complex on tumor growth *in vivo*. Finally, our data indicate for the first time that the potential of siRNA-loaded nanoemulsion CD73 as a therapeutic alternative for the treatment of GBM. Nevertheless there is a need for further studies to understand the effect of treatment of complex NE-CD73-siRNA on tumor growth *in vivo*. Despite the need for further studies to understand the effect of treatment of complex NE-CD73-siRNA on tumor growth *in vivo*.

Keywords: glioma; ecto-5'-NT/CD73; RNA interference; nanoemulsion

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais alterações gênicas presentes nos gliomas.....	19
--	----

Lista de Figuras

Figura 1. Vias de liberação do ATP para o meio extracelular	22
Figura 2. Os receptores purinérgicos e seus respectivos agonistas.....	24
Figura 3. A estrutura das ectonucleotidases ancoradas a membrana plasmática	26

Lista de Abreviaturas

5'-NT/CD73 - Ecto-5'-nucleotidase
ADA - Adenosina deaminase
ADP – Adenosina difosfato
AMP – Adenosina monofosfato
AMPc – AMP cíclico
AMPCP - Adenosina 5'-(α,β -metileno) difosfato
AP - Fosfatase alcalina
ATP - Adenosina trifosfato
DOTAP - 1,2-dioleoil-3-trimetil amônio propano
EGFR - Receptor de fator de crescimento epidermal
E-NPPs - Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDase - Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
GBM – Glioblastoma Multiforme
GRO α - Citocina
HIF-1 – Fator 1 induzido por hipóxia
HIV – Síndrome da imunodeficiência adquirida
ICC - Imunocitoquímica
IDH1 - Isocitrato desidrogenase 1
IF – Imunofluorescência
IFN tipo I – Interferon tipo 1

IL-1 β – Interleucina 1beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos

MDR1 – Gene resistência a múltiplas drogas

MGMT - O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase

MIF – Fator inibidor da migração de macrófagos

miRNAs - *Micro* RNAs

mRNA - RNA mensageiro

MTT - 3(4, 5-dimethyl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide)

NANC - Não adrenérgica – Não colinérgica

NE – Nanoemulsões

OMS - Organização Mundial da Saúde

p53- Gene supressor tumoral

PDI- Índice de polidispersão

PTEN - Gene supressor tumoral

RB- Proteína retinoblastoma

RNAi - RNA de interferência

siRNAs - *Small interfering* RNA

SNC- Sistema Nervoso Central

TCM – Triglicerídeos de cadeia média

TGF β – Fator de transformação do crescimento beta

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

Tregs - Linfócitos T regulatórios

Sumário

1. Introdução	14
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. Revisão de literatura	17
3.1. Gliomas	17
3.2. Glioblastoma multiforme	19
3.3. Sistema purinérgico	21
3.3.1. Receptores purinérgicos	23
3.3.2. Ectonucleotidases	24
3.4. Adenosina e tumores	26
3.5. RNA de interferência	30
3.6. Nanoemulsões	31
4. Artigo	35
5. Conclusão	69
6. Referências	71

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 Organização Mundial da Saúde, 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 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, 1976). 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). Segundo Burnstock (2008), os nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular podem ainda regular funções patofisiológicas em diversos tecidos, incluindo doenças nas 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 do grupo das ectonucleotidases que está 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 nesses tumores, colaborando para processos de neovascularização, migração e invasão (SPYCHALA, 2000).

O processo celular de silenciamento gênico pós-transcricional dependente de RNA por sequências específicas vem sendo utilizado na atualidade. Estudos de silenciamento da expressão gênica com small interfering RNA (siRNAs) em células de GBM tem sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar a eficiência do tratamento desse tumor. Uma limitação dessa técnica é seu sistema de entrega à célula alvo. Portanto, houve a necessidade da busca de alternativas para sistemas de liberação de siRNA. Dentro dessas alternativas, destaca-se as nanoemulsões catiônicas (NE). Já utilizadas na nutrição parenteral, tendo como característica a boa tolerância para administração in vivo. Além disso, as NE são consideradas sistemas cineticamente estáveis com potencial para carrear fármacos (BRUXEL, 2012). Nesse sentido, propõe-se unir a biotecnologia com o sistema de RNA de interferência (RNAi) com a inovação farmacotécnica das estruturas nano para silenciar enzima do sistema purinérgica 5'-NT/CD73, que está altamente expressa/ativa em tumores do tipo GBM como sendo uma nova alternativa terapêutica.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Propor a utilização da ecto-5'-NT/CD73 como um novo alvo molecular para o tratamento dos gliomas.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do inibidor da 5'-NT/CD73, AMPCP, sobre a proliferação celular e a hidrólise de AMP em linhagem de glioma C6.
- Caracterizar as propriedades físico-químicas e a morfologia do complexo formado pela nanoemulsão e sequências de RNA de interferência para 5'-NT/CD73 (siRNA-CD73);
- Investigar a citotoxicidade da nanoemulsão catiônica em cultura primária de astrócitos e em linhagem de glioma C6;
- Analisar a expressão e a atividade enzimática da 5'-NT/CD73 em células de glioma C6 após silenciamento utilizando o complexo nanoemulsão - siRNA-CD73.
- Avaliar a proliferação celular em células de glioma C6 após silenciamento com siRNA-CD73;

3.Revisão de literatura

Gliomas

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que possuem uma característica em comum: crescimento celular desordenado. Estas células invadem tecidos e órgãos, e ainda podem apresentar a capacidade de migrar para outras regiões do corpo formando metástases (INCA). Ao longo da progressão tumoral, as células cancerígenas apresentam seis características biológicas que as diferenciam das células normais, incluindo manutenção da sinalização proliferativa, escape de supressores do crescimento, imortalidade replicativa, resistência à morte celular, indução de angiogênese, a qual está relacionada à invasão tecidual, e formação de metástases. Além dessas seis características importantes, podemos acrescentar também fatores como a instabilidade genômica e a presença de um microambiente inflamatório, os quais também contribuem de forma expressiva para o desenvolvimento tumoral (HANAHAHAN et al., 2011; LIMA et al., 2012). Portanto, entendemos que a gênese e a progressão tumoral é um processo complexo e multifatorial.

Os gliomas são tumores que apresentam características gênicas e morfológicas similares a glia e estão entre as mais importantes neoplasias sólidas do sistema nervoso central (SNC), correspondendo a mais de 30% dos tumores malignos. Embora a transformação neoplásica de células gliais diferenciadas seja tradicionalmente assumida como um mecanismo da gliomagenese, existe uma teoria recente e já aceita sobre sua formação. Tal teoria sugere que este tipo de tumor origina-se de células progenitoras neurais que sofreram transformação oncogênica durante seu desenvolvimento, vindo a se tornar células iniciadoras de

tumor (SANAI et al., 2005; PICCIRILLO e VESCOSI, 2007; PICCIRILLO et al., 2009). Estudo recente demonstrou que gliomas podem ainda se originar de células diferenciadas na região central do SNC, incluindo os neurônios corticais e astrócitos (FRIEDMANN-MORVINSKI et al., 2012). Além das células tronco tumorais, o ambiente inflamatório é um fator decisivo para a gliomagenese. Nos gliomas, o infiltrado inflamatório está correlacionado com o aumento da malignidade tumoral (DEMUTH e BERENS, 2004). A OMS em 2007 classificou os gliomas para determinar o tipo de terapia utilizada no tratamento, utilizando três parâmetros: tipo celular, localização tumoral e grau de malignidade (LOUIS et al., 2007, BRAT et al., 2007, FULLER e SCHEITHAUER, 2007; NAKAZATO, 2008). Com base no tipo celular, a classificação é feita de acordo com a aparência morfológica das células, sendo classificadas em: astrocitomas, oligodendroglioma e gliomas mistos. A classificação em relação à localização tumoral se refere ao local onde os gliomas se desenvolvem com base numa membrana que separa o cérebro do cerebelo, onde os gliomas que se desenvolvem acima dessa membrana são denominados supra-tentoriais e os que se desenvolvem abaixo são os infra-tentoriais (VOUGIOUKAS et al., 2005; KALOSHI et al., 2009). De acordo com o grau de malignidade, a divisão dos gliomas se dá numa escala de I a IV. Os gliomas de baixo grau se dividem em grau I e II. O principal glioma de grau I é denominado astrocitoma pilocítico e é caracterizado por lesões não infiltrativas, com baixo potencial proliferativo, sem atipias nucleares, mitoses, proliferação endotelial ou necrose. Enquanto que o de grau II apresenta lesões em geral infiltrativas, com atipias nucleares e baixo índice mitótico, sem proliferação endotelial ou necrose e são denominados como astrocitoma difuso, oligodendroglioma e oligoastrocitoma. Gliomas de alto grau são os de grau III e IV. Gliomas de grau III são denominados de astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico e apresentam lesões infiltrativas, atipias nucleares e alto índice mitótico. Por fim, o glioma de grau IV é denominado de GBM, caracterizado por lesões infiltrativas, atipias nucleares, elevado índice mitótico, proliferação endotelial e grau de necrose. Na tabela 1 estão apresentadas as principais alterações genéticas e características morfológicas presentes nos gliomas, bem como o tempo de sobrevida dos pacientes (Portaria do Ministério da Saúde nº599 de 26 de junho de 2012).

Tabela 1. Principais alterações gênicas presentes nos gliomas.

GLIOMAS	ALTERAÇÕES GENÉTICAS	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	SOBREVIDA PACIENTE
Glioma Grau I	Mutação p53 Super expressão PDGF-R	Lesões não infiltrativas, com baixo potencial proliferativo, sem atipias nucleares, mitoses, proliferação endotelial ou necrose	5 – 10 anos
Glioma Grau II	Deleção 19q Deleção 10p Mutação RB Amplificação CDK4/6	Lesões em geral infiltrativas, com atipias nucleares e baixo índice mitótico, sem proliferação endotelial ou necrose	2 -3 anos
Glioma Grau III	Deleção 10q Mutação PTEN	Lesões infiltrativas, atipias nucleares e alto índice mitótico.	9 – 14 meses
Glioma Grau IV	Mutação INK4aARF Amplificação e Mutação EGFR Amplificação Ciclina D1/3 Amplificação MDM2 ou 4 LOH 10p e 10q	Lesões infiltrativas, atipias nucleares, elevado índice mitótico, proliferação endotelial e grau de necrose	9 – 12 meses

Adaptado de Portaria do Ministério da Saúde nº599 de 26 de junho de 2012.

Glioblastoma multiforme

A forma mais maligna dos gliomas é denominada de GBM, considerado um dos tumores mais agressivos e de pior prognóstico com sobrevida média inferior a doze meses (DAI e HOLLAND, 2001). Entre as características marcantes do GBM estão incluídas o elevado grau de proliferação vascular, necrose, alta densidade e atipia celular. O GBM pode surgir diretamente como glioma de grau IV ou vir a se tornar um glioma mais maligno a partir da progressão de um glioma de baixo grau. Os sintomas clínicos dessa neoplasia incluem dores de cabeça progressivas, déficits neurológicos focais e convulsões (LIMA et al., 2012). Entre as características histológicas mais comuns, incluem-se a presença de células neoplásicas pouco diferenciadas com áreas de proliferação vascular e/ou necrose (SATHORNUSUMETEE et al., 2008). A massa tumoral do GBM aparece de forma localizada preferencialmente no lobo frontal e temporal no compartimento supratentorial, mas pode ocorrer também no cerebelo, no tronco cerebral e na medula (LIMA et al., 2012).

Uma variedade de alterações genéticas foram identificadas nos GBM, incluindo: amplificação ou ativação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) (YAN et al., 2011), mutação ou inativação do gene *P53* (gene supressor tumoral) (VOUSDEN, 2009) mutação na *PTEN* (gene supressor tumoral; regulação da migração celular e invasão), deleção do inibidor de progressão do ciclo celular p16 (controle da progressão do ciclo celular da fase G1 para S) (ONGAKI e

KLEIHULES, 2007). Outra mutação que ocorre nos gliomas é nos genes codificadores da isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) responsável por ativar a via de transcrição induzida por hipóxia (HIF-1), a qual facilita a adaptação das células tumorais a ambientes com privação de nutrientes e de oxigênio (GUO et al., 2011). Existem também alterações na via da proteína do Retinoblastoma (pRB – proteína supressora tumoral) e mutações no gene O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT – alvo de ação de quimioterápicos agentes alquilantes do DNA, como por exemplo a temozolomida) que se torna uma das responsáveis pelo desenvolvimento de quimioresistência (LI et al., 2012; HEGI et al., 2008). O tecido cerebral que circunda o tumor apresenta elementos de resposta inflamatória, incluindo ativação de macrófagos, invasão vascular e formação de edema. As células inflamatórias constituem um componente fundamental da resposta fisiológica ao tumor e se tornam um importante componente para o processo de transformação e a progressão do tumor (PERSANO et al, 2013). Além disso, existe uma proposta que sugere que as células tumorais possam modular a resposta imune ao seu favor por meio da secreção de citocinas. A ideia proposta por Chen e colaboradores (2008), é dividida em três etapas: (1) Recrutamento: via produção de citocinas (IL-8), as células tumorais recrutam células imunes para o microambiente tumoral; (2) Educação: pela secreção de citocinas que regulam diferenciação celular (IL-6, TNF α), as células tumorais induzem as células imunes a desempenhar funções de suporte a progressão tumoral e (3) Resposta: as células imunes diferenciadas produzem citocinas, hormônios e fatores de crescimento que promovem crescimento tumoral e desenvolvimento de tolerância imune (CHEN et al., 2008).

Evidências da literatura apontam para o envolvimento do sistema purinérgico no desenvolvimento e na progressão do GBM (WINK et al., 2006; MORRONE et al., 2003, BRAGANHOL et al., 2009), uma vez que tais tumores apresentam alterações na via de metabolização de nucleotídeos extracelulares, apresentando baixa atividade ATPDásica e elevada atividade AMPásica (WINK et al, 2003).

O maior obstáculo para o tratamento do GBM deve-se as suas características heterogêneas. A terapia existente envolve ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia (STUPP, 2005). Uma razão para a falta de avanços clínicos no tratamento do GBM tem sido a compreensão insuficiente de

mecanismos de progressão e de recorrência da gliomagenese (FRIEDMANN-MORVINSKI et al., 2012). Os agentes disponíveis para a terapêutica apresentam eficácia limitada o que torna necessária a pesquisa de novos alvos terapêuticos proporcionando alternativas ao tratamento desse tipo de tumor (LIMA et al, 2012; PERSANO et al, 2013).

Sistema Purinérgico

O conceito de neurotransmissão purinérgica surgiu em 1972 quando Burnstock demonstrou em seu experimento que o ATP (adenosina trifosfato) extracelular era responsável pela neurotransmissão não adrenérgica – não colinérgica (NANC). Segundo a hipótese de Burnstock (1976), o ATP extracelular atua como transmissor simpático e parassimpático e atualmente sabe-se que este atua no SNC (BURNSTOCK 2009, 2012).

Apesar de serem atribuídas aos nucleotídeos ações estritamente intracelulares como fornecimento de energia para processos intracelulares como transporte ativo, motilidade celular e biossíntese, já está estabelecido o conceito de que essas moléculas também atuam como mensageiros extracelulares (BURNSTOCK, 1978). O sistema purinérgico está envolvido em diversos processos biológicos, como proliferação celular, diferenciação, apoptose, inflamação e neurotransmissão (BURNSTOCK, 2009). Também os nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular podem ainda regular funções patofisiológicas, incluindo doenças inflamatórias, neurodegenerativas, doenças vasculares e câncer (BURNSTOCK, 2008).

Para ser considerado um neurotransmissor, a molécula em questão necessita ter um sistema de liberação controlada, receptores específicos e um sistema de finalização do estímulo (BURNSTOCK, 2006). O ATP, um dos principais agonistas do sistema purinérgico, se encaixa nesses três processos, conforme descritos a seguir. Quanto à forma de liberação para o meio extracelular, uma das formas mais conhecidas de extravasamento de ATP para o meio extracelular é por meio de processo de lise/dano celular, tornando esse nucleotídeo um importante sinal de injúria celular (BURNSTOCK, 2006). Entretanto, dados recentes da literatura têm apontado para a participação de outros sistemas de liberação, tais como os canais panexinas e conexinas

(ABBACCHIO, 2009). Estes canais são proteínas transmembrana que se unem entre si para formar hemicanais, por onde ocorreria a passagem de nucleotídeos para meio extracelular (RANGEL, 2011). Ainda, existem suposições de outras formas de passagem para o meio extracelular como transportadores e vesículas de transporte por exocitose (BODIN et al., 2001; BURNSTOCK, 2007; LAZAROWSKI et al., 2003). As principais formas de liberação de ATP para o meio extracelular estão apresentadas na Figura 1.

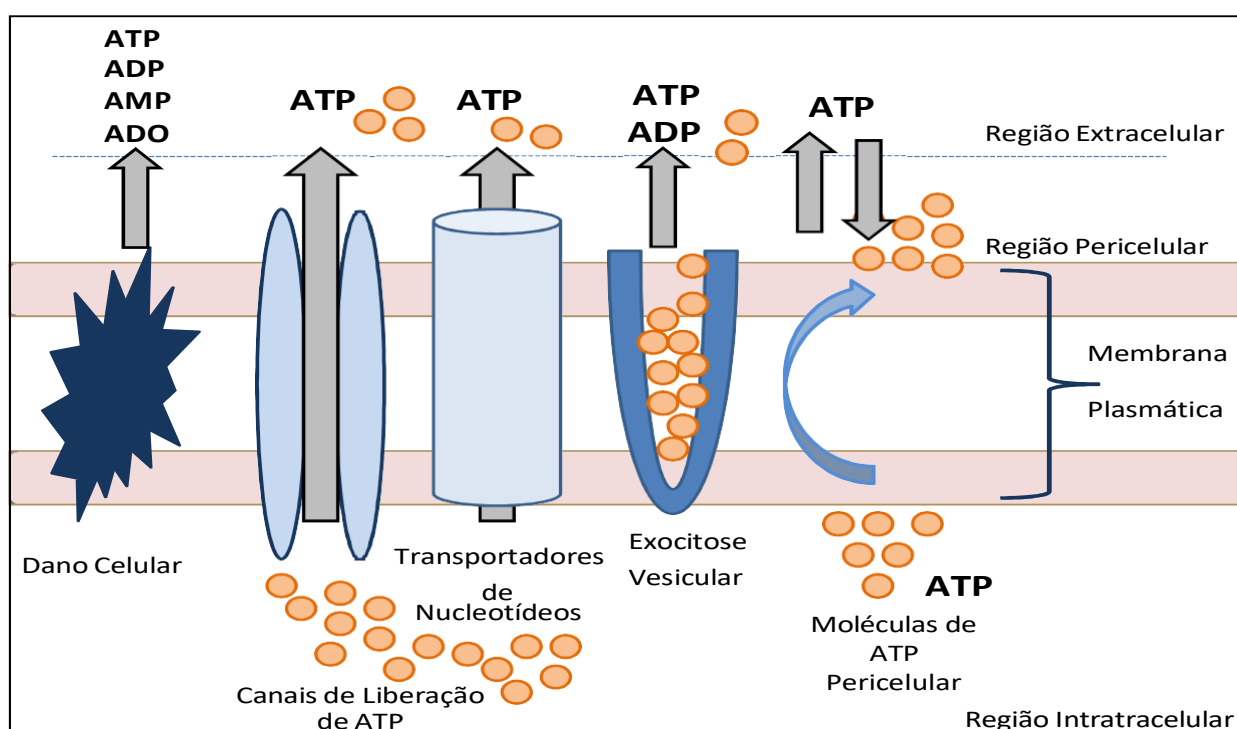


Figura 1. Vias de liberação do ATP para o meio extracelular (adaptado de Yegutkin, 2008).

Os efeitos biológicos dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares são exercidos via sensibilização de receptores purinérgicos conhecidos como purinoreceptores, os quais são divididos em P1, que possuem a adenosina como principal agonista ou em receptores do tipo P2, com o ATP e o ADP como os principais agonistas (ABBACCHIO et al., 1994).

Um importante fator que modula a resposta mediada por nucleotídeos via ativação dos seus respectivos receptores é o metabolismo extracelular dos mesmos pelas ectonucleotidases (sistema de finalização do estímulo). As ectonucleotidases compreendem um grupo de enzimas que estão envolvidas na

degradação de nucleotídeos e na formação de nucleosídeos, possuindo, portanto um papel chave na regulação da sinalização purinérgica (ROBSON et al., 2006).

Receptores Purinérgicos

Após a liberação do nucleotídeo e/ou nucleosídeo para o meio extracelular, o mesmo irá interagir com seu respectivo receptor permitindo a continuação da cascata de sinalização purinérgica. Os purinoreceptores são denominados de P1 e P2 (ABBRACCHIO et al., 1994). Os receptores P2 são subdivididos em P2X e P2Y (BURNSTOCK, 2004). Os receptores do tipo P2X são canais ionotrópicos permeáveis a íons como Na^+ , K^+ e Ca^{+2} , sendo responsáveis por mediar uma sinalização celular rápida. Tais receptores são ativados exclusivamente pelo ATP e, de acordo com a estrutura e com a afinidade por esse nucleotídeo, são posteriormente subdivididos em 7 subtipos (P2X1-7). Por outro lado, os receptores metabotrópicos P2Y são constituídos de oito subtipos (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) e são acoplados à proteína-G. Ao contrário dos receptores P2X, os receptores P2Y são sensibilizados por diferentes nucleotídeos, incluindo o ATP, ADP, UTP e UDP, e medeiam sinalização de longa duração, regulando efeitos tróficos, desenvolvimento e diferenciação celular (DI VIRGILIO et al., 2000; ROBSON et al., 2006). Já os receptores metabotrópicos P1 para adenosina são divididos em quatro subtipos A1, A2A, A2B e A3 conforme afinidade pela mesma (FREDHOLM et al., 2001; ABBRACCHIO et al., 1994). Os receptores A1 e A3 são de efeito inibitório, pois reduzem os níveis de AMP cíclico (AMPc) intracelular; enquanto os receptores A2A e A2B aumentam os níveis de AMPc intracelular por isso exercem efeitos estimulatórios (FREDHOLM et al., 2001). Os receptores purinérgicos e os seus respectivos ligantes encontram-se apresentados na Figura 2.

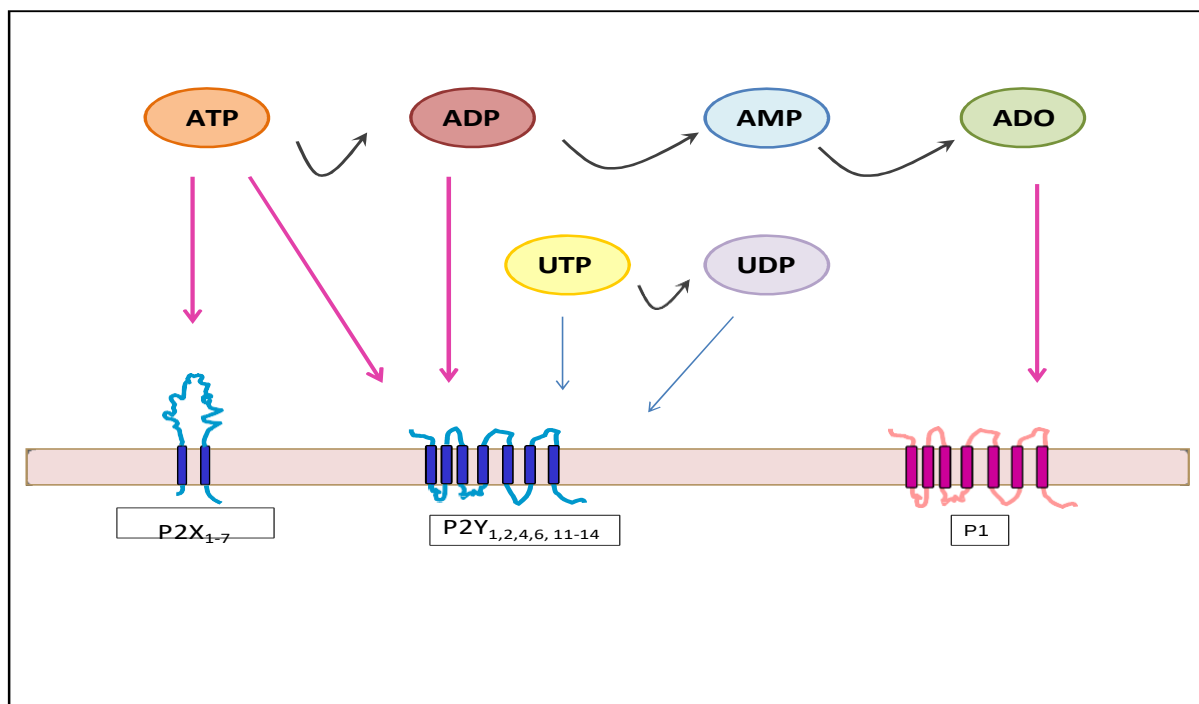


Figura 2. Os receptores purinérgicos e seus respectivos agonistas (adaptado de Yegutkin, 2008).

Na sequência da transdução de sinal, os nucleotídeos necessitam ser rapidamente inativados pela metabolização enzimática extracelular via ectonucleotidases, que tem como principais objetivos a geração de agonistas para a ativação de receptores P2Y ou P1 ou, ainda, a finalização do estímulo (ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN, 2012).

Ectonucleotidases

A degradação enzimática é um mecanismo envolvido no controle da concentração de ATP e de outros nucleotídeos/nucleosídeos no meio extracelular. As ectonucleotidases compreendem uma família de enzimas que catalisam a interconversão de nucleotídeos no compartimento extracelular. Nesse grupo de enzimas estão incluídas: as ecto-nucleosídeo-trifosfo-difosfohidrolases (E-NTPDases), as ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPs), a ecto-5'-nucleotidase/CD73 (5'-NT/CD73), as ecto-fosfatases alcalinas (AP) e a adenosina deaminase (ADA) representadas na Figura 3 (ROBSON et al., 2006; ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN, 2012). Essas ectoenzimas constituem uma cascata enzimática eficiente, com habilidade de controlar a concentração e o tempo em que os nucleotídeos/nucleosídeos permanecem no espaço extracelular (ZIMMERMANN, 2001). As E-NTPDases convertem o ATP (ou ADP) em AMP, o

qual é hidrolisado a adenosina pela ação da 5'-NT/CD73. Uma característica que essas ectoenzimas possuem em comum é a capacidade de hidrolisar nucleotídeos tri ou difosfatos, mas não monofosfatos e exigem presença de cátions divalentes como o Ca^{+2} e o Mg^{+2} como cofatores para máxima atividade (MEGHJI et al., 1995).

As E-NTPDases contêm sequências altamente conservadas conhecidas como regiões conservadas da apirase. Existem na superfície celular como NTPDase1,2,3 e 8 e também intracelular como NTPDase4, 5, 6 e 7. Apesar de serem estruturalmente semelhantes, essas enzimas diferem na especificidade por substrato, refletindo diretamente sobre o metabolismo extracelular dos nucleotídeos e controlando os efeitos biológicos mediados pelos purinoreceptores (ZIMMERMANN et al., 2006).

As E-NPPs consistem de sete ectoenzimas que foram numeradas de acordo com sua ordem de descoberta. Apenas as três primeiras E-NPPs são capazes de hidrolisar vários nucleotídeos, incluindo ATP e ADP, sendo, portanto, relevantes na cascata de sinalização purinérgica (GODING et al., 2003).

Atualmente são conhecidas sete enzimas da família da 5'-NT/CD73 em humanos, onde cinco delas estão localizadas no citosol, uma na matriz mitocondrial e uma ancorada na membrana plasmática (KAWASHIMA, 2000). A 5'-NT/CD73 é uma enzima ligada à membrana plasmática por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol e apresenta 70 kDa. Essa enzima participa do sistema purinérgico por catalisar a defosforilação extracelular do AMP até adenosina. Portanto, sua principal função biológica é em consequência dessa atividade enzimática (ZIMMERMANN, 1992; ZHANG, 2012; RESTA, 1988; ZHANG, 2010). O controle da sua atividade enzimática é importante para a manutenção dos níveis extracelulares de adenosina e, também, dos efeitos mediados via receptores P1. Além da função catalítica, essa enzima está envolvida em interações célula-célula e célula-matriz (FASTBOM et al., 1987; VOGEL et al., 1991). Tal enzima desempenha papel fisiológico no transporte de íons, na função plaquetária, na homeostase endotelial e na cardioproteção em resposta a isquemia, além de participar de processos fisiopatológicos como lesão de tecidos, inflamação e progressão tumoral (BEAVIS, 2012; WANG, 2013).

A 5'-NT/CD73 é expressa em diferentes tecidos como cólon, rim, cérebro, coração, fígado e pulmão (ALLARD et al., 2012) e tipos celulares, incluindo

linfócitos, células endoteliais e células dendríticas (ZHANG, 2012). Também está associada ao endotélio vascular dos grandes vasos como a aorta, carótidas e coronárias (KOSZALKA et al., 2004; ZIMEMERMANN, 1992).

As fosfatases alcalinas (AP) são enzimas ubíquas presentes em muitos organismos, desde bactérias ao homem que hidrolisam nucleotídeos tri-, di- e monofosfato, pirofosfato assim como monoésteres de ácido fosfórico. No entanto seu papel na regulação da sinalização purinérgica ainda não está bem estabelecido (ZIMMERMANN et al., 2012). A adenosina desaminase (ADA) é uma enzima importante na inativação das purinas, sendo responsável por catalisar a desaminação irreversível da adenosina em inosina. Essa enzima é amplamente expressa no intestino, timo e baço (IWAKI-EGAEWA, 1997). Além da localização citosólica, a ADA pode ser expressa como uma ectoenzima nas superfícies de linfócitos e células dendríticas, participando ativamente do sistema purinérgico por regular os níveis de adenosina, uma molécula imunossupressora, no meio extracelular (BLACKBURN et al., 2005; SPYCHALLA, 2000).

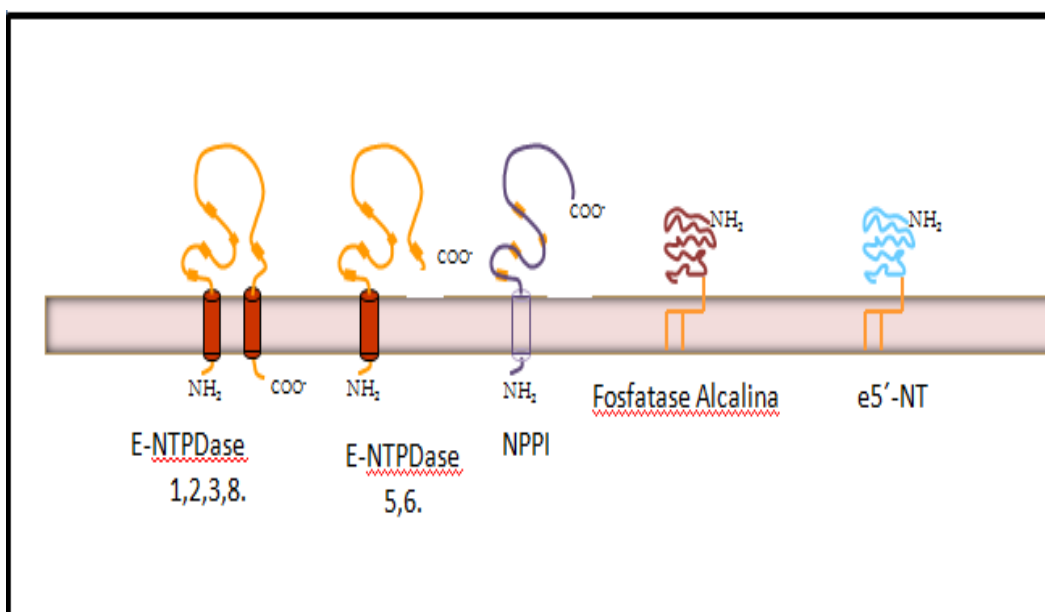


Figura 3. A estrutura das ectonucleotídeses ancoradas a membrana plasmática (adaptado de www.ccri.ca/sevigny.html).

Adenosina e tumores

A adenosina se encontra no meio extracelular, provavelmente por difusão passiva ou transporte ativo intracelular; ou ainda pela hidrólise enzimática extracelular de ATP via cascata das ectonucleotídeses, onde a enzima chave para

a geração de adenosina é a 5'-NT/CD73 (THORN, 1996; ZHANG, 2010). Os nucleosídeos, como a adenosina, são moléculas hidrofílicas e exigem determinados transportadores para entrar nas células. Os transportadores de adenosina se dividem em dois grupos: equilibrativos e concentrativos. Uma comparação da afinidade do nucleosídeo para com os transportadores sugere que, o transportador do tipo concentrativo tem uma maior afinidade pelo substrato que o transportador equilibrativo (THORN, 1996). Dos transportadores concentrativos destaca-se a família SLC28, que consiste em três subtipos de transportadores de nucleosídeos dependentes de sódio: CNT1, CNT2 e CNT3. Análogos de nucleosídeos podem ser usados para tratar uma variedade de condições patológicas incluindo a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a leucemia, e uma variedade de tumores sólidos. Portanto, esses subtipos de transportadores da família SLC28 são determinantes na resposta de terapias anti-câncer, onde modulam a entrada destes análogos em tecidos-alvo. Como por exemplo, CNT3 transporta um número de análogos de nucleosídeos antineoplásicos incluindo cladribine, gemcitabina, 5 – fluorouridina, fludarabina e zebularina (GRAY et al., 2004).

Em relação aos equilibrativos existe a família de proteínas SLC29, que corresponde a quatro membros de transportadores (hENT1, hENT2, hENT3, hENT4). Dentre os transportadores, o hENT1 desempenha um papel importante na captação celular de medicamentos quimioterápicos atualmente utilizados como a cladribina, citarabina, fludarabina, gemcitabina e capecitabina. O aumento de hENT1 pode vir a contribuir para a seletividade relativa da quimioterapia (BALDWIN et al., 2004). Porém, existe pouca informação sobre as propriedades moleculares dessas proteínas. Estudos adicionais sobre a caracterização bioquímica e regulação do transporte de nucleosídeos são necessários, especialmente no contexto da transformação de estados de doenças neoplásicas, já que transportadores como os da família SLC28 são farmacologicamente importantes por mediar o transporte de drogas clinicamente relevante (GRAY et al., 2004).

Durante uma situação de homeostase no organismo, a adenosina age através dos receptores de alta afinidade A1 e A2A, mas em condições patológicas, como por exemplo em processos tumorais (quando as concentrações de adenosina encontram-se elevadas), a ativação dos receptores de baixa afinidade

A2B e A3 pode tornar-se relevante (BEAVIS, 2012). Dados na literatura sugerem que a adenosina regula tanto o crescimento do câncer quanto sua disseminação, interferindo na proliferação de células tumorais, na apoptose e na formação de metástases, através da ligação a seus receptores específicos que também são expressos em células neoplásicas. Vários tumores apresentam alterações nos receptores de adenosina, como por exemplo o câncer de mama em que os receptores do tipo A1 estão superexpressos e essa ativação promove a proliferação celular por regulação negativa p27. Além disso, em tumores de cólon os receptores do tipo A2B apresentam expressão aumentada quando comparados ao tecido normal. Neste contexto, o desenvolvimento neoplásico de células do cólon foi adiada pela inibição farmacológica de receptores A2B utilizando o antagonista seletivo MRS1754, sugerindo que os receptores A2B possuem propriedades na promoção do câncer (HASKO, 2013).

A maior expressão e/ou regulação positiva da 5'-NT/CD73 foi descrita pela primeira vez em células de glioma por Ludwig e colaboradores (1999). Diversos outros tipos de câncer também apresentam essa mesma situação incluindo câncer de mama, bexiga, pulmão, pâncreas, ovários, tireóide, próstata, leucemia e melanoma (SADEJ et al., 2006; STAGG et al., 2010; ZHI et al., 2010). A elevada expressão da 5'-NT/CD73 foi correlacionada com neovascularização tumoral, invasão e formação de metástases (BEAVIS et al., 2012). A magnitude da angiogênese formada pelo tumor correlaciona-se diretamente com a formação de metástases (ALLARD et al., 2012). Fatores presentes no microambiente tumoral como a hipóxia (HIF) e fatores solúveis (IFN tipo I, TNF- α , IL-1 β , Prostaglandina E2 e TGF-beta) contribuem para regulação positiva da 5'-NT/CD73 e, consequentemente, para a progressão tumoral, o comportamento agressivo do tumor e para um pior prognóstico para o paciente (HEDDLESTON, 2009; JENSEN, 2009; XU, 2013). Portanto, essa enzima desempenha papel importante no controle do crescimento e progressão tumoral; processo que é dependente de angiogênese (WANG, 2013).

Segundo Wink e colaboradores (2003), além da função catalítica, a 5'-NT/CD73 por si só pode ser considerada um fator proliferativo envolvido em processos de crescimento celular e diferenciação. Nesse estudo foi demonstrado que células de glioma exibem significativamente maior atividade de defosforilação de AMP em adenosina quando comparadas com as células análogas normais, os

astrócitos. Estudos relataram que a 5'-NT/CD73 também participa de interações célula-célula e célula-matriz e na promoção tumoral já que esta modula a adesão celular (CAPPELLARI et al., 2012).

A expressão e a atividade da 5'-NT/CD73 estão reguladas positivamente em células tumorais, sendo responsável pela produção extracelular de adenosina. Segundo Stagg e colaboradores (2010), a adenosina gerada a partir da atividade da 5'-NT/CD73 via sensibilização do receptor A2A representa uma importante via utilizada pelo tumor para desencadear imunossupressão e, com isso, inibir a geração de uma resposta imune adaptativa. Assim, entende-se que as células tumorais contribuem para os níveis elevados de adenosina no microambiente tumoral através do aumento da expressão da 5'-NT/CD73. Além disso, recentemente foi descoberto que as células tumorais são hábeis em secretar para o microambiente pequenas vesículas denominadas de exosomas, as quais são enriquecidas em ectonucleotidases representando 20% do total da atividade ATPásica, compondo uma estratégia adicional para a geração de adenosina (CLAYTON et al., 2011). O acúmulo de adenosina pode representar uma estratégia dos tumores para contornar a imunovigilância, já que esse nucleosídeo suprime a resposta antitumoral das células T, além de induzir a produção de citocinas antiinflamatórias, metabólitos imunossupressores e de recrutar células imunes como os linfócitos T regulatórios (Tregs) para o sítio tumoral (BEAVIS, 2012).

A terapia alvo é uma alternativa e também pode ser considerada uma abordagem efetiva para controlar o crescimento tumoral, pois de acordo com os resultados de Stagg e colaboradores (2011), o bloqueio farmacológico *in vivo* da 5'-NT/CD73 com um inibidor seletivo APCP ou anticorpo monoclonal anti-CD73 reduziu significativamente o crescimento do tumor de mama e a formação de metástases. Logo, a inibição da 5'-NT/CD73 pode ser considerada um adjuvante terapêutico para a imunoterapia do câncer, sendo considerada complementar as terapias convencionais (que incluem cirurgia, radio- e/ou quimioterapias) (BEAVIS et al., 2012; ZHANG et al., 2010 e 2012).

Essas evidências demonstram que a sinalização purinérgica está envolvida nos principais meios de integração da atividade funcional entre células do SNC. Logo, alterações nessas vias de comunicação podem mediar eventos de inflamação, neurodegeneração e câncer (BURNSTOCK, 2008).

RNA de interferência

RNA de interferência (RNAi) é um processo celular de silenciamento gênico pós-transcricional dependente de RNA por sequências específicas. Desde que foi descoberto por Fire e colaboradores em 1998, o RNAi representa uma promessa na inibição da expressão gênica *in vivo* e *in vitro* e uma ferramenta de pesquisa para compreender como a expressão gênica induz respostas celulares morfológicas (KANEDA et al., 2010). O RNAi apresenta aproximadamente entre 21 e 23 nucleotídeos, dupla fita RNAi que desencadeia a clivagem de sequências específicas de RNA mensageiro (mRNA) levando a sua degradação (GAO et al., 2011).

O mecanismo de interferência envolve uma maquinaria enzimática específica e é guiado por dois tipos de moléculas: os micro RNAs (miRNAs) ou *small interfering RNA* (siRNAs), os quais são responsáveis por regular a expressão gênica endógena ou exógena, respectivamente (KANEDA et al., 2010). Considerando que a técnica de RNAi é um excelente método de silenciamento, a utilização de siRNA tem se mostrado uma estratégia promissora para terapia gênica em diversas patologias, como doenças neurodegenerativas (Esclerose Amiotrófica Lateral) e câncer (direcionando o gene de resistência a múltiplas drogas MDR1 para resensibilização à quimioterapia) (AAGARD et al., 2007; LIMA, 2012).

Sendo a molécula de siRNA carregada negativamente, ela é suscetível a ação de nucleases séricas, depuração renal e biodistribuição não direcionada ao alvo. Assim, o siRNA quando utilizado de forma isolada apresenta algumas limitações de uso, como falta de estabilidade, meia-vida curta e baixa eficiência. Atualmente, o maior obstáculo enfrentado pelas estratégias terapêuticas que utilizam RNAi, é o sistema de liberação da molécula até alvo desejado (GAO et al., 2011).

Os primeiros sistemas de liberação de ácidos nucleicos efetivos foram os vetores virais. Entretanto, o potencial de mutagenicidade, a capacidade de carga limitada, os elevados custos de produção, e principalmente, os riscos de segurança causados pelos seus efeitos inflamatórios e imunogênicos limitaram a aplicação e consequente a utilização desse sistema (GUO et al., 2009). Portanto,

houve a necessidade da busca de alternativas não virais para sistemas de liberação de siRNA.

Atualmente existem sistemas de entrega de sequências siRNA não virais que incluem a modificação química de siRNA, nanopartículas para entrega siRNA e peptídeos célula-penetrantes direcionados para liberação (GAO et al., 2011). Os lipossomas catiônicos, os quais são considerados estratégias transportadoras usadas para complexar com siRNA e realizar sua liberação na células alvo são outros exemplos de sistemas de entrega (FRAGA et al., 2011).

Muitos estudos de silenciamento da expressão gênica com siRNAs em células de GBM tem sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar a eficiência do tratamento desse tumor. Estes demonstraram que a inibição da expressão da glutaminase por siRNA em linhagem celular D54 de GBM resultou em diminuição do crescimento de células indicando este como uma nova possibilidade terapêutica (SELTZER et al., 2010). Assim sendo, o silenciamento da expressão gênica utilizando a técnica de siRNA para diferentes alvos terapêuticos pode ser considerado uma nova ferramenta para inibir o crescimento do GBM (PEREZ, 2011).

Nanoemulsão

As nanoemulsões (NE) são definidas como sistemas heterogêneos nos quais um líquido (fase interna) é disperso em outro (fase externa) na forma de gotículas, na presença de um agente emulsionante. Visando estabilidade do sistema formado e a administração parenteral, devem-se controlar as características físico-químicas, bem como a composição da formulação e as condições de preparo. As NE são considerados sistemas cineticamente estáveis com potencial para carrear fármacos (BRUXEL et al., 2012).

A complexação de nucleotídeos em sistemas lipídicos catiônicos como, por exemplo as NE, tem se mostrado um método promissor para sua administração *in vivo* (TEIXEIRA et al., 1999). Nesse sentido, as NE catiônicas geralmente constituídas de um núcleo oleoso estabilizado por uma mistura de fosfolípidios e lipídeos catiônicos têm sido propostas como prováveis sistemas de liberação de moléculas e fármacos, além da segurança na utilização há mais de 40 anos como

fonte de calorias e ácidos graxos essenciais em formulações parenterais (SILVA et al., 2006, MARTINI et al., 2007, BRUXEL et al., 2011, BRUXEL et al., 2012).

Os nucleotídeos formam de maneira espontânea um complexo em meio aquoso via interações eletrostáticas entre os grupamentos fosfato e os grupamentos carregados positivamente dos lipídeos catiônicos. Essas nanoestruturas por apresentarem carga positiva em sua superfície, favorecem a penetração intracelular dos nucleotídeos em decorrência das interações com cargas negativas das membranas plasmáticas celulares. Outra vantagem da formação desse complexo entre nucleotídeos e sistemas lipídios catiônicos é a redução da cinética enzimática de degradação de nucleotídeos frente ao ataque enzimático das nucleases (TEIXEIRA et al., 1999, MARTINI et al., 2007, MARTINI et al., 2008, NAM et al., 2009, BRUXEL et al., 2011). Uma limitação para o tratamento de gliomas é a barreira hematoencefálica que dificulta a entrada de quimioterápicos no SNC, portanto o potencial das NE pode ser utilizado no sentido de carrear fármacos para essa região e assim possibilitar novas alternativas terapêuticas (MOUSSEAU et al., 1993).

As técnicas de preparação de emulsões submicrométricas podem ser classificadas como métodos de alta e baixa energia. A homogeneização a alta pressão, microfluidificação e sonicação são exemplos de metodologias que utilizam alta energia para formação de NE, sendo muito efetivas para a redução do diâmetro de partícula. Porém, devido a forma de preparo, tais condições podem se tornar inadequadas para fármacos lábeis e macromoléculas. Portanto, a alternativa indicada nesses casos é a utilização de métodos de baixa energia como emulsificação espontânea, difusão de solvente e inversão de fase de temperatura (BRUXEL et al., 2012).

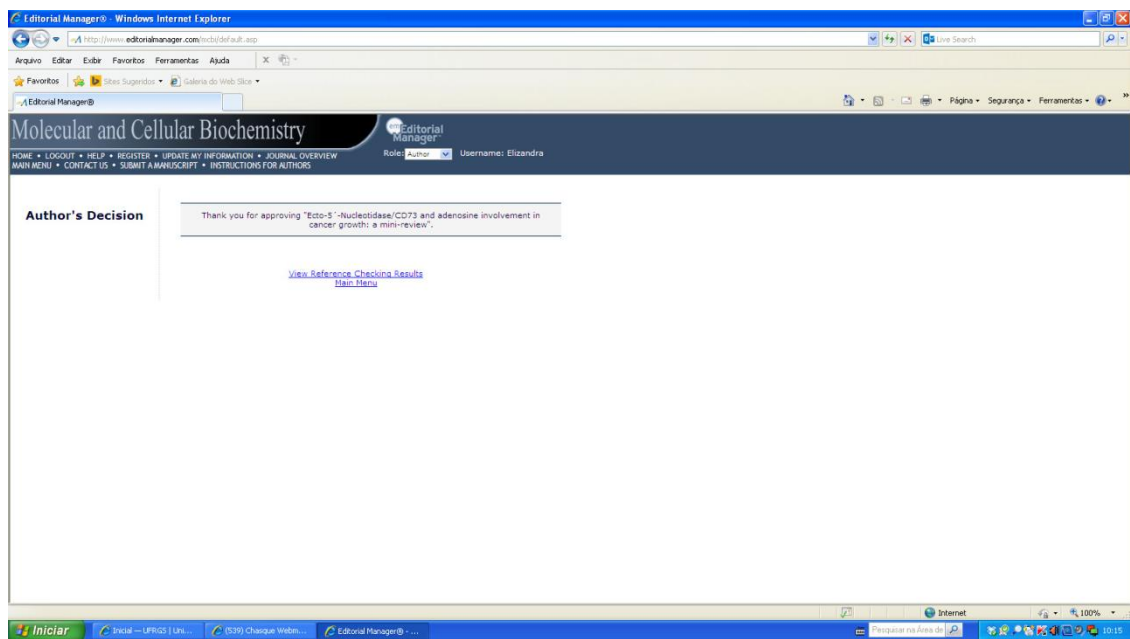
Quanto à forma de preparação das NE catiônicas, foi indicado na literatura o procedimento de emulsificação espontânea para a complexação com os macromoléculas (BRUXEL et al., 2012). O interesse da utilização desse método é a preparação de pequenos lotes de formulação, em temperatura moderadas, em estudos de bancada. Essa técnica consiste em solubilizar os constituintes da fase oleosa e da fase aquosa em uma mistura de etanol/acetona (70:30) e água, respectivamente. Logo após, a fase orgânica é vertida através de um funil calibrado, sob agitação moderada e constante, na fase aquosa, seguido da

retirada do solvente através de destilação sob pressão reduzida em um evaporador rotatório (SILVA et al., 2006; MARTINI et al., 2007).

A composição básica da NE é de fase oleosa, interface e fase aquosa. Como exemplo de fase oleosa temos os triglicerídeos de cadeia média (TCM), obtidos pela re-esterificação de ácidos graxos do óleo de coco fracionados com glicerina. Para a interface, os fosfolipídios comumente utilizados podem ser obtidos de fontes naturais, como as lecitinas de origem animal (gema de ovo) ou vegetal (soja). A adição de lipídeos catiônicos como DOTAP nessa fase, contendo grupamentos amino na sua estrutura ocorre visando a administração de ácidos nucléicos. Na fase aquosa podemos incluir isotonzantes como o glicerol para a obtenção de soluções com características osmóticas semelhantes às dos fluidos biológicos (MARTINI et al., 2008; NAM et al., 2009, BRUXEL et al., 2012;).

Após a formação de sistemas dispersos, como as NE, é necessária a caracterização da estrutura formada através das propriedades físico-químicas. Parâmetros analisados são o diâmetro da gotícula, potencial zeta, viscosidade e pH, onde cada propriedade é influenciada pela composição qualitativa e quantitativa do sistema (BRUXEL et al., 2012).

Como a principal dificuldade encontrada para a utilização de novas terapias com RNAi é o sistema de entrega/liberação para células ou tecidos alvos, os sistemas carreadores do tipo NE catiônica se mostram como uma promissora alternativa tanto pela carga positiva do complexo formado (NE + RNAi) que atravessa mais facilmente as membranas celulares quanto por possuir tamanho reduzido e uniforme na escala nano (AAGARD et al., 2007). Visando a resolução de problemas de estabilidade química e termodinâmica as nanopartículas, como por exemplo, as NE, apresentam vantajosa aplicação *in vivo* pela baixa imunogenicidade, baixa toxicidade e especificidade pelo alvo sem acúmulo indesejado em tecidos normais (SHU et al., 2013). Possíveis desvantagens encontradas nesses sistemas de entrega com base lipídica *in vivo* são rápido *clearance* hepático e alto custo de produção (AAGARD et al., 2007; SHU et al., 2013).



4. Artigo 1.

**CATIONIC NANOEMULSION AS A DELIVERY SYSTEM FOR siRNA
TARGETING ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 REDUCES GLIOMA
CELL VIABILITY**

Fernanda C. Teixeira^a, Fernanda Bruxel^b, Juliana H. Azambuja^a, Priscila T. Ramos^a,
Alexandre M. Berenguer^c, Iscia Lopes-Cendes^c, Marco A. Stefani^d, Jean Sevigny^{e,f},
Roselia M. Spanevello^a, Ana M. O. Battastini^g, Helder Teixeira^h, Elizandra
Braganhol^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências
Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, UFPEL, Pelotas, RS, Brasil.

^bGrupo de Pesquisa em Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia, UNIPAMPA,
Uruguaiana, RS, Brasil.

^cDepartamento de Genética Médica, Escola de Medicina, UNICAMP, Campinas,
SP, Brasil.

^dServiço de Neurologia do Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS, Brasil.

^eDépartement de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, Faculté de
Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada.

^fCentre de recherche du CHU de Québec, Québec, QC, G1V 4G2 Canada.

^gBioquímica UFRGS - Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^hPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre,
RS, Brasil.

***Corresponding Author**

Elizandra Braganhol (E-mail: elizandra.braganhol@ufrgs.br)

Bioquímica – Prédio 29; Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de
Alimentos

Universidade Federal de Pelotas - Campus Capão do Leão - s/n

CEP 96010900 - Caixa Postal 354; Pelotas, RS, Brasil

Phone: 55 53 3275 7355

FAX: 55 53 3275 7354

Abstract

Glioma is the most common malignant brain tumor and is characterized by high invasiveness, poor prognosis, and limited therapeutic options. Studies silencing the gene expression using RNA interference tool (siRNA) have been proposed as new alternative for therapy. We used the enzyme 5'-NT/CD73 as a new therapeutic target, because it is overexpressed in tumor solids. Evidence suggests the involvement of the 5'-NT/CD73 in cell proliferation, thus we used pharmacological inhibitor AMPCP that was able to reduce cell viability in glioma cells, confirming our hypothesis. We also investigated the effect of siRNA-CD73 treatment in C6 glioma. We observed that the NE-siRNA-CD73 complex was effective to knockdown the enzyme and to reduce AMPase activity and the C6 glioma viability. Is important to note that the nanostructured system (NE) was effective in complex to oligonucleotides as for delivering on target cells. Nevertheless there is a need for further studies to understand the effect of treatment of complex NE-CD73-siRNA on *in vivo* tumor growth. Finally, our data indicate at first time the potential of siRNA-CD73 loaded nanoemulsion as a therapeutic alternative to GBM treatment.

Key words: glioblastoma multiforme, siRNA-CD73, cationic nanoemulsion, drug delivery.

Introduction

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the worst and most common primary brain tumor (Dai and Holland, 2001). These tumors are characterized by a high proliferative and angiogenic phenotype as well as great potential to invade surrounding normal brain tissue (Stupp et al, 2005). Moreover, the presence of inflammatory microenvironment enriched in immune cells and cytokines is thought to support glioma progression and to contribute to chemoresistance (Mantovani, 2009). These characteristics contribute to poor prognosis for patients and a median survival of 14 months after diagnosis (Ohgaki and Kleihues, 2005; Soni et al, 2005; Roesler et al, 2010; Brennan et al, 2009). Therefore, the elucidation of cell pathways involved in tumor progression and the identification of new therapeutic targets to GBM treatment are urgently required.

Emerging evidence indicate that changes in purinergic signaling participate in glioma progression (Burnstock and Di Virgilio, 2013). Nucleotides and nucleosides, such as ATP and adenosine, mediate a wide variety of biological functions, including cell death, proliferation and immune response (Burnstock, 2009). Purinergic receptor activation is controlled by ectonucleotidases, which efficiently hydrolyze extracellular nucleotides to respective nucleosides in the extracellular space (Longhi et al, 2013).

Ecto-5'-nucleotidases/CD73 (5'-NT/CD73) is a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored nucleotidase that catalyzes the hydrolysis of extracellular AMP to adenosine. A high level of 5'-NT/CD73 expression has been reported in many human solid tumors, such as colon, lung, pancreas, ovary (Su et al, 2001), melanomas (Sadej et al, 2006) and breast carcinomas (Zhi et al, 2007). By increasing extracellular adenosine concentrations, 5'-NT/CD73 contributes to

proliferative, angiogenic, metastatic, and immunosuppressive effects (Burnstock and Di Virgilio, 2013). In addition, 5'NT/CD73 is also involved in cell-cell/cell-matrix interactions and its overexpression has been associated to increased migration and invasion properties (Zhou et al, 2007). Indeed, pharmacological inhibition (Braganhol et al, 2007; Cappellari et al, 2012) or blockade of CD73 with a monoclonal antibody significantly suppressed tumor growth and angiogenesis *in vivo* (Zhi et al, 2007; Allard et al, 2014). Therefore, this enzyme is of considerable interest as a novel drug target for the treatment of cancer.

Since the discovery of RNA interference (RNAi) (Fire et al, 2008), there has been strong interest in the development of RNAi-based therapeutics for selectively modulate gene expression as well as to inhibit protein synthesis in a variety of diseases, including cancer. Recently, siRNA approach has been considered as newer method to overcome GBM growth and increases patient's survival (Guo et al, 2010). Indeed, several groups are focusing on using siRNAs to knock-down specific genes involved in glioma angiogenesis and growth, MMP-9, (uPA) and its receptor uPAR, and VEGF and EGFR resulted in significant reduction of glioma angiogenesis and tumor growth in preclinical mouse models (Gondi et al, 2004; Gondi et al, 2007; Niola et al, 2006). However, the lack of specific and effective *in vivo* delivery methods, the rapid degradation of siRNA in biological fluids as well as their inability to efficiently cross blood brain barrier (BBB) reduces the potential effectiveness of siRNA-based therapies (Opalinska and Gewirtz, 2002).

An alternative to overcome these drawbacks is the employment of nanocarriers, such as nanoemulsions (NE), which are particularly advantageous for cancer therapy applications due to their high delivery efficiency and specificity (Brigger et al, 2002). Triglyceride-based nanoemulsions stabilized by phospholipid

and cationic lipid combinations have been studied as potential delivery systems for oligonucleotides (Teixeira et al, 2001; 2003). Besides its low toxicity to intravenous delivery, cationic NE associates to negatively charged siRNA via ion-pair formation, making possible the siRNA delivery to target cells or tissues (Teixeira et al, 2001).

Therefore, taken into account the role of 5'NT/CD73 in cancer progression and the advantages of siRNA-based therapeutics, the aim of the present study was to evaluate the potential of cationic NE as delivery system for siRNA targeting CD73. Herein, we report the design of new siRNA-CD73 sequences, the physicochemical characterization and biological evaluation of siRNA-cationic NE complexes synthesized. The results shown here give new insights into how CD73 knockdown may contribute to antiglioma therapy.

Materials and Methods

General cell culture procedures. C6 rat glioma cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA). Cells were grown in culture flasks and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 1% DMEM, 8.39 mM HEPES (pH 7.4), 23.8 mM NaHCO₃, 0.1% fungizone, 0.5 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco BRL) and supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco). Cell cultures were kept at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂ and allowed to grow to confluence. Primary astrocyte cultures were prepared as previously described (Wink et al, 2003). Briefly, cortex of newborn Wistar rats (1-2 days old) were removed and dissociated mechanically in a Ca⁺² and Mg⁺² free balanced salt solution, pH 7.4, (137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.27 mM Na₂HPO₄, 1.1 mM KH₂PO₄, and 6.1mM glucose).

After centrifugation at 1000 rpm for 5 min, the pellet was suspended in DMEM supplemented with 10% FBS. The cells (1×10^5) were plated in poly-L-lysine-coated 96-well plates. After 4-h plating, plates were gently shaken and phosphate-buffered saline (PBS)-washed, and medium was changed to remove neuron and microglia contaminants. Cultures were allowed to grow to confluence by 20–25 days. Medium was replaced every 4 days. All procedures were approved by the Ethics Committee For Animal Experimentation from under number 10321.

Small interfering (siRNA) design and synthesis. For silencing the rat CD73 gene, two siRNA sequences, namely siRNA-CD73-961 and siRNA-CD73-980 were designed from the rat ecto-5'-nucleotidase/CD73 gene (Nt5e; NM_021576.2) using the Selection Program (Whitehead Institute for Biomedical Research siRNA, <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>). Searches of the genome database (BLAST, <http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) were carried out to ensure that these sequences would not target any other rat genes. A non-targeting RNA green fluorescent protein sequence (siRNA-GFP), which does not target any known mammalian gene, was designed and used as the negative control. The siRNA sequences were synthesized as described in Table 1 (Sigma Genosys).

Preparation and characterization of nanoemulsions (NE). NE composed of 8% (w/w) MCT, 2% (w/w) egg lecithin, 0.132% (w/w) DOTAP, 2.25% (w/w) glycerol and water to 100% (w/w) were prepared through spontaneous emulsification as previously described (Martini et al., 2008). Briefly, a lipid ethanolic solution containing the oily phase components was slowly added to a water phase containing

glycerol under moderate magnetic stirring. The excess of solvents mixture (ethanol/water) was then removed under reduced pressure at 50°C until the desired final volume (5 mL). The final cationic lipid concentration was 2 mM, as previously optimized (Martini et al., 2008). The mean droplet size and zeta potential were determined through photon correlation spectroscopy and electrophoretic mobility (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument, UK), respectively, at 20°C. The NE was adequately diluted in water for size and polydispersity index (PDI) determinations or in 1 mM NaCl solution for zeta potential measurements.

Preparation and characterization of NE/siRNA complexes. siRNA-GFP, siRNA-CD73-961 or siRNA-CD73-980 sequence adsorption on cationic NE was performed at the end of the manufacturing process, resulting in NE/siRNA complexes (NE/siRNA-GFP, NE/siRNA-CD73-961 or NE/siRNA-CD73-980). Increasing concentrations of NE were added to water solutions of siRNA sequences (1 μ M final concentration) and incubated during 15 min at room temperature, as described elsewhere (Teixeira et al., 1999). The physicochemical properties and morphology of NE/siRNA complexes were evaluated as described above. They were prepared at three different +/- charge ratios (ratios calculated between the number of positive charges from the cationic lipid present in NE, and the number of negative charges from the phosphate groups of ON) that were +0.1/-; +0.5/- and +2/-.

Cell transfection procedures. C6 glioma cell transfection with siRNA sequences (siRNA-GFP, siRNA-CD73-961 or siRNA-CD73-980) was performed using Lipofectamine® (Lipofectamine RNAiMax, Invitrogen) glioma cell cultures at approximately 70% confluence in 24-well plates, according to the manufacturer's

instructions. For NE/siRNA complex transfection, the complexes were prepared as described above and the C6 glioma cells were transfected applying the forward or the reverse protocol. Briefly, in forward transfection, 2×10^4 glioma cells were seeded in a 24-well plates, the transfection mix was prepared and added the next day. In reverse transfection, the complexes were prepared inside the well of 24-well plates, after which 2×10^4 glioma cells and medium were added. Glioma cells were exposed to NE/siRNA complexes for 24, 48 and 72 h.

Adenosine 5'-(α,β -methylene) diphosphate (AMPCP) treatment. AMPCP (Sigma, USA) was dissolved in sterile water at concentration of 100 mM under heating and further diluted in DMEM/5% FBS to obtain 1, 10 or 100 μ M, final AMPCP concentrations. C6 glioma cells were seeded at 2×10^4 cells/well in DMEM/5% FBS in 24-well plates. The cells were allowed to growth for 24 h. Then, semi-confluent C6 glioma cells were treated with AMPCP (1-100 μ M) for 48 h. Control cells were exposed to DMEM/5% FBS.

Ecto-5'NT/CD73 enzyme assay. The AMPase activity were determined in C6 glioma cells, as described previously (Braganhol et al, 2008), in incubation medium (2 mM $MgCl_2$, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES [pH 7.4], and 2 mM of AMP) incubated at 37°C for 10 min. The release of inorganic phosphate (Pi) and the protein concentration were measured by the Malachite Green (Chan et al, 1986) and Coomassie Blue (Bradford, 1976) methods, respectively. Specific activity was expressed as μ mol Pi released/min/mg protein.

Cell counting. C6 glioma cells were seeded at 2×10^4 cells/well in DMEM/5% FBS in 24-well plates. At the end of the AMPCP treatment, the medium was removed, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and 200 μ L of 0.25% trypsin solution (Gibco/BRL) was added to detach the cells, which were counted in a hemocytometer.

Cell viability assay. C6 glioma cells (5×10^3 cells/well) or primary astrocytes were exposed to siRNA\NE complexes and following 48 h cell viability was evaluated by 3-(4,5- dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). This method is based on the ability of viable cells to reduce MTT to a blue formazan product. MTT solution (sterile stock solution of 5 mg/mL) was added to the incubation medium in the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL. The cells were left for 60 min at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The medium was then removed and plates were shaken with DMSO for 30 min. The optical density of each well was measured at 492 nm. Results were expressed as absorbance.

Ecto-5'-NT/CD73 Immunofluorescent staining (IF). C6 glioma cell cultures were fixed in 10% phosphate-buffered formalin mixed with cold acetone and washed three times for 10 min in PBS. Cells were then incubated in 7% FBS prepared in PBS containing 0.2% Tween-20 for 45 min at room temperature. These sections were incubated 90 min at room temperature with the primary antibody rabbit polyclonal anti-CD73 (1:1000; rNu-9LI₅) diluted (Fausther et al, 2011) in 7% FBS prepared in PBS containing 0.2% Tween-20. They were then incubated with FITC-conjugated goat anti-rabbit (1:1000) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.,

Gaithersburg, MD, USA) for 60 min at room temperature. Sections were counterstained with DAPI blue (1:10000) for 5 min at room temperature. Images were captured using a digital camera connected to the microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

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

Results

Selective inhibitor of ecto-5'-NT/CD73, AMPCP, decreases glioma cell proliferation. First, we analyzed the ecto-5'-NT/CD73 activity in C6 glioma cells comparing to primary astrocytes, a nontransformed model of glial cells. In contrast to astrocytes, C6 glioma exhibited an increased AMPase activity (0.013 ± 0.001 versus 0.12 ± 0.01 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ of protein, for astrocytes and C6 cells, respectively; Fig. 1A), which was followed by a high cell expression of CD73 on glioma cells (Fig. 1B). Then, we evaluated whether the selective ecto-5'/CD73 inhibitor treatment affects glioma cell proliferation. C6 glioma cells were exposed to increasing AMPCP concentrations (1, 10 and 100 μM). Following 48 h of treatment, cell proliferation was evaluated by cell counting. In parallel, the activity of the enzyme ecto-5'NT/CD73 was assessed by hydrolysis of AMP to Adenosine (ADO) by malachite green method. The C6 glioma treatment with AMPCP (100 μM) resulted in a decrease of ~30% of cell proliferation when compared to control (Fig. 1C). In addition, 10 μM and 100 μM AMPCP treatment reduced the AMP

hydrolysis in 40 and 50%, respectively (Fig. 1D). These results show that ecto-5'NT/CD73 is overexpressed in glioma cells and its pharmacological inhibition is important for reducing glioma cell proliferation.

New siRNA-CD73 sequences were efficient to reduce ecto-5'NT/CD73 expression in glioma cells. As increased 5'NT/CD73 expression is a positive factor to cancer development, including glioblastoma (Fig. 1), we hypothesized that ecto-5'NT/CD73 knockdown by siRNA strategy would be an interesting tool to control glioma progression. To this end, specific siRNA-CD73 sequences named siRNA-CD73-961 and siRNA-CD73-980 were designed (Table 1) and its functionality/specificity was evaluated by transfecting C6 glioma cells using Lipofectamine® according to the manufacturer's instructions. Following 48 h of transfection, ecto-5'NT/CD73 protein expression and enzyme activity were evaluated by immunocytochemistry (ICC) and AMP hydrolysis, respectively. Cells transfected with siRNA-GFP sequence were used as control. As shown in Figure 2, CD73-siRNA sequences were efficient to reduce ecto-5'NT/CD73 protein expression (Fig. 2A) and AMP hydrolysis when compared to control and siRNA-GFP transfected cells (Fig. 2B). Of note, no cytotoxicity was detected in glioma cells following the transfection (data not shown). These results indicate that siRNA-CD73 sequences designed were efficient and specific to reduce the ecto-5'NT/CD73 expression and enzyme activity in C6 glioma cells and they were further applied in the experiments to develop nanoemulsions (NE).

Properties of NE and NE-siRNA-CD73 complexes. Nanoparticles and cationic polymer carriers have been investigated as promising carries for oligonucleotide

delivery and an alternative to viral vectors (Martini et al, 2007). Here, NE was chosen as vector for siRNA-CD73 delivery. Following siRNA-GFP and siRNA-CD73 adsorption on cationic NE, the physicochemical properties of complexes were evaluated (Table 2). The mean droplet size of NE ranged from 249.9 to 526.52 nm and polydispersion index (PI) varied from 0.1 to 0.6. Zeta potential values from NE/siRNA complexes were lower than zero, resulting in variations in their size between preparations. Overall, these characteristics are in accordance with the other systems of NE reported in literature (Fraga et al, 2011; Bruxel et al, 2012). For adsorption studies, NE/siRNA-CD73 complexes were prepared at two different +/- charge ratios (+0.1/-; +0.5/-) and TEM was performed (Fig. 3). The analysis revealed oil droplets with typical appearance of oil/water emulsion with droplet exhibiting a size of approximately 250-500 nm, according to physicochemical characterization. Interestingly, NE/siRNA-CD73 complexes showed a high electronic density at the interface (Fig. 3C-H). It is well established that oligonucleotides interact with uranyl acetate resulting in dark staining regions. These data indicate that siRNA-CD73 sequences were adsorbed at the interface of NE droplet. Therefore, the siRNA-CD73 complexes were further applied as oligonucleotide carriers in *in vitro* experiments using cell cultures.

NE-siRNA complexes are not citotoxic to primary astrocyte cultures

Since cationic NE has been associated to toxicity in biological systems (Gao et al, 2011), the transfection protocol in glioma cells was optimized in order to equalize high transfection performance and low cytotoxicity. To this end, NE/siRNA-GFP complexes were prepared at three different +/- charge ratios (+0.1/-; +0.5/-; +2/-) and C6 glioma cells were transfected applying the forward or the reverse protocol as

described in material and methods. Following 24, 48 and 72 h of exposition, glioma cell viability was evaluated by MTT (Fig. 4A-F). Forward C6 glioma transfection resulted in ~50% cell toxicity after 48 and 72 h of NE/siRNA-GFP complex treatment compared to untreated cells (Fig. 4A-C). For reverse transfection, C6 glioma exposition to NE/siRNA-GFP complexes at +0.1/- and +0.5/- charge ratio for 48 h did not alter cell viability (Fig. 4E), while 72 h of exposition resulted in cytotoxicity of 50% to +0.5/- and +2/- charge ratios tested (Fig. 4F). Taken together, these data indicate that reverse complex transfection resulted in lower C6 cytotoxicity when compared to forward protocol. Therefore, the NE/siRNA complexes at two different +/- charge ratios (+0.1/-; +0.5/-) and the reverse protocol for 48 h of exposition was applied in the subsequent experiments. Finally, the NE/siRNA complexes cytotoxicity was also evaluated in primary astrocytes cultures, a model of non-tumor cell. Astrocytes were exposed to +0.1/- and +0.5/- NE/siRNA-GFP complexes for 48 h and cell viability was analyzed by the MTT. Notably, the complexes did not promote astrocyte toxicity when compared to control, indicating the safety of formulations (Fig. 5).

NE/siRNA-CD73 complexes were efficient to knockdown ecto-5'NT/CD73 expression in glioma cells

Next to physicochemical characterization and transfection protocol optimization, we assessed the efficacy of NE/siRNA-CD73 complexes knockdown through protein expression and enzyme activity. Expression of ecto-5'-NT/CD73 protein, as determined by IF analysis was found to be significantly lower in cells exposed to NE/siRNA-CD73 complexes, whereas there were no changes in cells exposed to NE/siRNA-GFP complexes (Fig. 6A and B). Similarly, the AMPase activity was

greatly reduced in the knockdown cells (70% and 63% reduction for siRNA-CD73-961 and siRNA-CD73-980, respectively; Fig. 6C). Therefore, the NE/siRNA-CD73-961 and 980 complexes were efficient and selective to knockdown CD73 in C6 glioma cells. Furthermore, the NE/siRNA-CD73-961 and 980 (+0.1/-) against the *CD73* gene decreased the number of viable cells in 20% and 35%, respectively, as assessed by MTT assay (Fig. 7). Taken together, these data suggest that the cationic NE was efficient to carrier the siRNA-CD73 sequences to glioma cells and that CD73 is an interesting target to glioma treatment.

Discussion

This paper demonstrates how the genomic silencing of ecto-5'-NT/CD73 can be considered a therapeutic strategy for GBM treatment. First, we evaluated the effect of the selective ecto-5'-NT/CD73 inhibitor, AMPCP, on cell proliferation and enzymatic activity parameters. We found that the inhibition of this enzyme was really efficient to reduce both C6 glioma proliferation and AMPase activity. Further, we used the siRNA tool to knockdown the ecto-5'-NT/CD73 at expression level. Two siRNA-CD73 sequences were designed and the cell delivery of oligonucleotides was performed by complexion to nanostructured systems such as NE. Our results indicated that the siRNA sequences were efficiently complexed to NE particles. The NE/siRNA formulation did not promote toxicity to astrocytes, a model of normal glial cell and were effective to silencing ecto-5'-NT/CD73 at protein expression and enzyme activity levels. Finally, ecto-5'-NT/CD73 knockdown decreased the C6 glioma viability, indicating the effectiveness of NE/siRNA-CD73 complexes to inhibit glioma progression.

Recent studies indicate that changes in purinergic signaling are involved in tumor progression (Braganhof et al, 2009; Burnstock and Di Virgilio, 2013). It is well known that ecto-5'NT/CD73 ecto-enzyme is overexpressed in tumors, including melanoma, prostate, breast carcinoma and glioma (Forte et al, 2012; Yang et al, 2013; Zhou et al, 2007). Accordingly, here we showed that ecto-5'NT/CD73 expression and activity are increased in C6 glioma when compared to astrocytes. In order to verify whether the abrogation of AMPase activity can influence C6 cell proliferation, we used AMPCP as a pharmacological enzyme inhibitor. We observed that AMPCP was effective in reduce cell proliferation by inhibiting CD73 enzyme activity, as previous described in literature for other kinds of tumors. Indeed, Zhou and collaborators showed that AMPCP treatment decreased MDA-MB-231 breast cancer cell viability in a dose-dependent manner without affect normal cells, indicating a selective anti-cancer activity (Zhou et al, 2007). Similarly, CD73 overexpression in T-47D and MCF-7 breast carcinoma cell lines increased invasiveness and motility ability which was reverted by AMPCP treatment (Zhou et al, 2007). Since extracellular adenosine produced by ecto-5'NT/CD73 stimulates glioma proliferation mainly through activation of its A3 receptor (Morrone et al, 2003), we suggest that the inhibition of AMPase activity by AMPCP reduces the extracellular adenosine levels resulting in C6 cell proliferation abrogation.

Taken in consideration the lack of effective therapies to GBM treatment, we further develop a cationic NE as delivery system for siRNA targeting ecto-5'NT/CD73. The siRNA-based therapy is a promising tool to gene expression silencing and has multiple applications to cancer treatment (Aagard et al, 2007; Lima et al, 2012). In addition, the application of nanocarriers to drug/oligonucleotide delivery is an interesting strategy to overcome the BBB,

improving the efficiency of brain tumor treatment. Then, we developed two sequences of siRNA-CD73 and complex it to NE carrier. The NE/siRNA-CD73 characteristics were evaluated at three different charge ratios (+0.1/-; +0.5/-; +2/-) with growing NE concentrations added to equal concentration of siRNA-CD73 or siRNA-GFP. NE exhibited a positively charged interface which is essential to siRNA adsorption at different charges ratios. The main physicochemical characteristics of the NE obtained here are in accordance with that reported in previous studies using NE obtained through the spontaneous emulsification procedure under similar conditions (Fraga et al, 2011; Bruxel et al, 2011). Moreover, siRNA established complexes to NE as assessed by TEM and the formulation exhibited stability as indicated by size and potential zeta analyses. Notably, NE/siRNA complexes were not cytotoxic to primary astrocyte culture, indicating safety to further applications.

To study the efficiency of siRNA-CD73 complexes to knockdown ecto-5'NT/CD73, we performed a series of experiments *in vitro* using C6 glioma cultures. Our results showed that siRNA-CD73 delivery by NE promoted a significant decrease in ecto-5'NT/CD73 expression in C6 glioma cells at enzyme activity and protein levels. These results suggest that once interactions with the cell membrane have been established, the siRNA-CD73 complexed to cationic NE is internalized into C6 glioma cytoplasm. Although the mechanisms by which NE/siRNA complexes pass through the cell membrane are not completely understood, studies suggest that a net positive charge particle may facilitate interactions with the negatively charged constituents of cell membrane which may favor siRNA delivery (Kaneda et al, 2010; Bruxel et al, 2011). In this sense, the participation of protein membrane, mainly clathrin and caveolin, has been studied

as possible mechanisms involved in nanostructure delivery to target cells (Parat and Riggins, 2012). These points will be properly addressed in a future study.

In according to the idea that CD73 has promoting cancer actions, NE/siRNA-CD73 treatment also decreased the C6 cell viability. Indeed, strategies targeting CD73 on cancer cells by either siRNA knockdown or blocking antibodies abrogate cancer progression and metastasis by both decreasing angiogenesis and inducing immune evasion (Terp et al, 2013; Allard et al, 2014). In addition to generate extracellular adenosine, CD73 plays a role as adhesion protein, acting in cell-cell cell-ECM interactions which are important to cancer development (Zhou et al, 2007; Cappellari et al, 2012).

In summary, our data indicate at first time the potential of siRNA-CD73 loaded NE as a therapeutic alternative to GBM treatment. The NE/siRNA-CD73 complexes were efficient delivered to glioma cells and decreased ecto-5'NT/CD73 expression and cell viability. Our findings support further studies to test NE/siRNA-CD73 complexes in a pre-clinical glioma model as a novel therapeutic modality for the treatment of brain tumors in the future.

Conflict of interest statement. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements: This work was supported by the Brazilian funding agencies: Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA – Proc. 11-0167); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – Proc. 12/2011-7). F.C.

Teixeira was a recipient of a Master Scholarship from Capes; P.T. Ramos and J.H. Azambuja were recipients of a Scientific Initiation Scholarship from FAPERGS.

References

- Aagard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59:75–86. 2007.
- Allard B, Turcotte M, Spring K, Pommey S, Royal I, Stagg J. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer*. Mar 15;134(6):1466-73. 2014.
- Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppes D, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AM. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. *Cancer Science*. 100(8): 1434-42. 2009.
- Braganhol E, Tamajusuku AS, Bernardi A, Wink MR, Battastini AM. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Biochimica et Biophys Acta*. Sep;1770(9):1352-9. 2007.
- Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, Holland E. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations, *PLoS ONE* 4. e7752. 2009.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54:631–651. 2002.
- Bruxel F, Cojean S, Bochot A, Teixeira H, Bories C, Loiseau PM, Fattal E. Cationic nanoemulsion as a delivery system for oligonucleotides targeting malarial topoisomerase II. *International Journal of Pharmaceutics*. 416. 402-409. 2011.
- Bruxel F, Laux M, Wild LB, Fraga M, Koester LS, Teixeira FH. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova*, vol. 35. Nº 9. 1827-1840. 2012.
- Burnstock G. Purinergic signalling: past, present and future. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.. Jan;42(1):3-8. Epub 2008 Oct 3. 2009.
- Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*. Dec; 9(4):491-540. 2013.
- Cappellari AR, Vasques GJ, Bavaresco L, Braganhol E, Battastini AM. Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion. *Molecular Cell Biochemistry*. Jan;359(1-2):315-22. 2012.
- Dai C, Holland EC. Glioma models. *Biochimica et Biophysica Acta* 1551:M19-M27. 2001.
- Fausther M, Lecka J, Soliman E, Kauffenstein G, Pelletier J, Sheung N, Dranoff A, Sévigny J. Co-expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 with specific NTPDase differentially regulates adenosine formation in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1302:G447-G459. 2011.

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806–811. 1998.
- Forte G, Sorrentino R, Montinaro A, Luciano A, Adcock IM, Maiolino P, Arra C, Cicala C, Pinto A, Morello S. Inhibition of CD73 Improves B Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity in a Mouse Model of Melanoma. *Journal of Immunology*. 189:2226-2233. 2012.
- Fraga M, Bruxel F, Lagranha VL, Teixeira HF, Matte U. Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2011.
- Gao Y, Liu XL, Li XR. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:1017-25.
- Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS. Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth. *Neuron Glia Biology*; 1:165-76. 2004.
- Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS. Intraperitoneal injection of a hairpin RNA-expressing plasmid targeting urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor and uPA retards angiogenesis and inhibits intracranial tumor growth in nude mice. *Clinical Cancer Research*. 13:4051-60. 2007.
- Guo D, Wang B, Han F, Lei T. RNA interference therapy for glioblastoma. *Expert Opinion Biology Therapy*. Jun;10(6):927-36. 2010.
- Kaneda MM., Sasaki Y, Lanza GM., Milbrandt J, Wicline S.A. Mechanisms of Nucleotide Trafficking during siRNA Delivery to Endothelial Cells using Perfluorocarbon Nanoemulsions. *Biomaterials*. April; 31(11):3079-3086. 2010.
- Lima FRS, Kahn SA, Soletti R, Biasoli D, Alves T, Fonseca ACC, Garcia C, Romão L, Brito J, Afonso RH, Faria J, Borges H, Moura-Neto V. Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1826(2):338-49. 2012.
- Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, Serra S, Deaglio S. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *Journal of Molecular Medicine*. Feb;91(2):165-72. 2013.
- Mantovani A. Cancer: inflaming metastasis. *Nature*. Jan 1;457(7225):36-7. 2009.
- Martini E, Carvalho E, Teixeira H. Adsorção de Oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. *Química Nova*, vol 30. Nº4. 930-934. 2007.
- Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, Bernardi A, Schwartzmann G, Rodnight R, Lenz G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *Journal of Neurooncology*. Sep;64(3):211-8. 2003.
- Niola F, Evangelisti C, Campagnolo L, Massalini S, Bue MC, Mangiola A, et al. A plasmid encoded VEGF siRNA reduces glioblastoma angiogenesis and its combination with interleukin-4 blocks tumor growth in a xenograft mouse model. *Cancer Biology Therapy*. 5:174-9. 2006.
- Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendrial gliomas, *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*. 64,479–489. 2005.

- Opalinska, J.B., Gewirtz, A.M. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 1, 503–514. 2002.
- Parat MO, Riggings GJ. Caveolin-1, caveolae, and Glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 14(6):679–688, 2012.
- Roesler R, Brunetto A.T, Abujamra A.L, de Farias C.B, Brunetto A.L, Schwartzmann G. Current and emerging molecular targets in glioma. *Expert Reviews Anticancer Therapy*. 10.1735–1751. 2010.
- Sadej R, Spychala J, Skladanowski A.C. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Research* 16(3):213-22. 2006.
- Soni, D, King J.A., Kaye A.H, Hovens C.M. Genetics of glioblastoma multiforme: mitogenic signaling and cell cycle pathways converge, *Journal Clinical Neuroscience*. 12. 1–5. 2005.
- Stupp R, Weber DC. The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma. *Onkologie*. Jun;28(6-7):315-7. Epub Jun 2. 2005.
- Su AI, Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, Dimitrov P, Lapp H, Schultz PG, Powell SM, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Hampton GM. Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Research* 61(20):7388-93. 2001.
- Teixeira, H., Dubernet, C., Chacun, H., Rabinovich, L., Boutet, V., Deverre, J.R., Benita, S., Couvreur, P.. Cationic emulsions improves the delivery of oligonucleotides to leukemic P388/ADR cells in ascite. *Journal of Controlled Release* 89, 473–482.2003.
- Teixeira, H., Dubernet, C., Rosilio, V., Laigle, A., Deverre, J.R., Scherman, D., Benita, S., Couvreur, P. Factors influencing the oligonucleotides release from O-W submicron cationic emulsions. *Journal of Controlled Release* 70, 243–255. 2001.
- Terp MG, Olesen KA, Arnspang EC, Lund RR, Lagerholm BC, Ditzel HJ, Leth-Larsen R. Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. *Journal of Immunology*. 2013 Oct 15;191(8):4165-73. 2013.
- Yang Q, Du J, Zu L. Overexpression of CD73 in Prostate Cancer is Associated with Lymph Node Metastasis. *Pathology and Oncology Research*. Volume 19, Issue 4, pp 811-814. 2013.
- Zhi X, Chen S, Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, Yin L. RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. *Clinical and Experimental Metastasis* 24(6):439-48. 2007.
- 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 Biology Therapy*. 6(3):426-31. 2007.

Legend to Figures

Figure 1. Analysis of ecto-5'-NT/CD73 activity/expression on C6 glioma cells and effect of AMPCP on cell proliferation. **(A)** AMPase activity in primary astrocyte and C6 glioma cell cultures was evaluated by malaquite green method. **(B)** Expression of ecto-5'-NT/CD73 on C6 glioma cells was assessed by IF analysis using anti-CD73 specific antibody. **(C)** C6 cells were treated for 48 h with AMPCP (1, 10 and 100 μ M) and cells were counted in a hemocytometer, control cells were exposed to DMEM/5% FBS. **(D)** C6 cells were treated with AMPC as described in (C) and the AMPase activity was evaluated by malaquite green method. The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test). *Significantly different from control ($P < 0.05$).

Figure 2. Evaluation of ecto-5'-NT/CD73 knockdown by specific sequences of siRNA-CD73. Two siRNA-CD73 sequences namely 961 and 980 were designed; C6 glioma was transfected using lipofectamine and the efficiency to knockdown ecto-5'-NT/CD73 was assessed by **(A)** IF analysis using anti-CD73 specific antibody and **(B)** AMPase activity evaluation by malaquite green method. Untreated or siRNA-GFP transfected cells were considered controls. The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test). * and #Significantly different from control and siRNA-GFP transfected cells, respectively. ($P < 0.05$).

Figure 3. Morphological characterization of nanoemulsion (NE)/siRNA-CD73 complexes. NE/siRNA-CD73-961 or NE/siRNA-CD73-980 complexes were prepared at two different +/- charge ratios (+0.1/-; +0.5/-) and transmission electronic microscopy (TEM) was performed. **(A)** Free siRNA-CD73-980, **(B)** blank NE, **(C)** (+0.5/-) NE/siRNA-CD73-980, **(D)** +0.5/- NE/siRNA-961, **(E, F)** +0.1/- NE/siRNA-CD73-980, **(G, H)** (+0.1/) NE/siRNA-CD73-961. Bars in figures: 50 nm - 500,000X magnification (A), 200 nm – 150,000X magnification (B, E), 0.5 μ m - 50,000 X magnifications (C, D, F, G, H).

Figure 4. Optimization of C6 glioma transfection using NE/siRNA complexes. NE/siRNA-GFP complexes were prepared at different +/- charge ratios (+0.1/-; +0.5/-; +2/-) and C6 glioma cells were transfected applying the forward (upper panel) or the reverse protocol (lower panel). Cell viability was determined by MTT following 24 h (A, D), 48 h (B, E) and 72 h (C, F) of complex exposition. The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test). *Significantly different from control cells ($P < 0.05$).

Figure 5. Analysis of cytotoxicity NE/siRNA-GFP complex on astrocyte cultures. Cell cultures were exposed to NE/siRNA-GFP complex prepared at two different +/- charge ratios (+0.1/-; +0.5/-) for 48 h, and the cell viability was assessed by MTT. Control cells were exposed to DMEM/10% FBS. The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test).

Figure 6. Evaluation of ecto-5'-NT/CD73 knockdown by NE/siRNA-CD73 complexes. C6 glioma was exposed to NE/siRNA-CD73-961 or NE/siRNA-CD73-980 complexes which was prepared at two different +/- charge ratios (+0.1/-; +0.5/-) and the efficiency to knockdown ecto-5'-NT/CD73 was assessed by **(A)** IF and **(B)** AMPase activity evaluation by malachite green method. Untreated or siRNA-GFP exposed cells were considered controls. The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test). ***Significantly different from control and siRNA-GFP transfected cells ($P < 0.05$, $P < 0.001$).

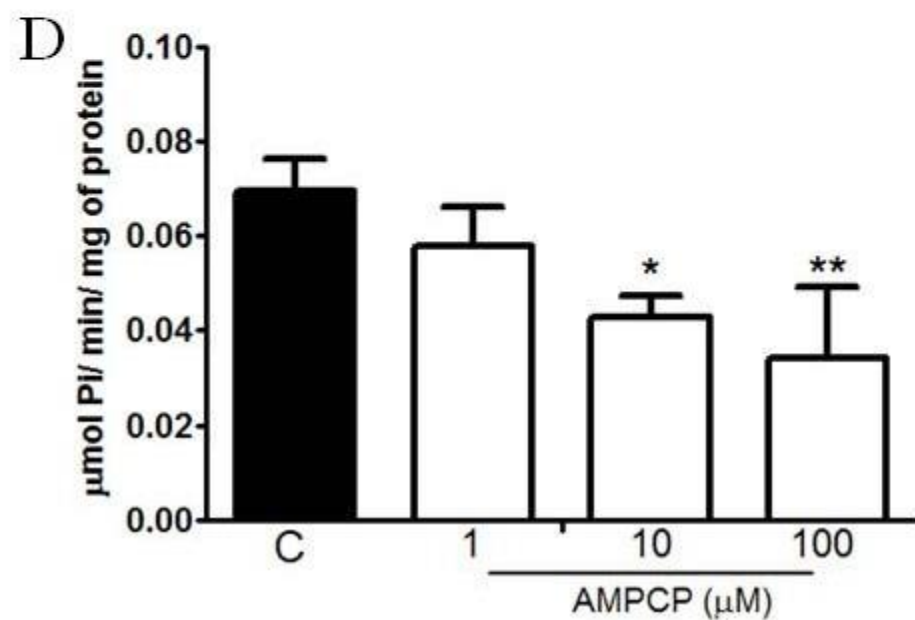
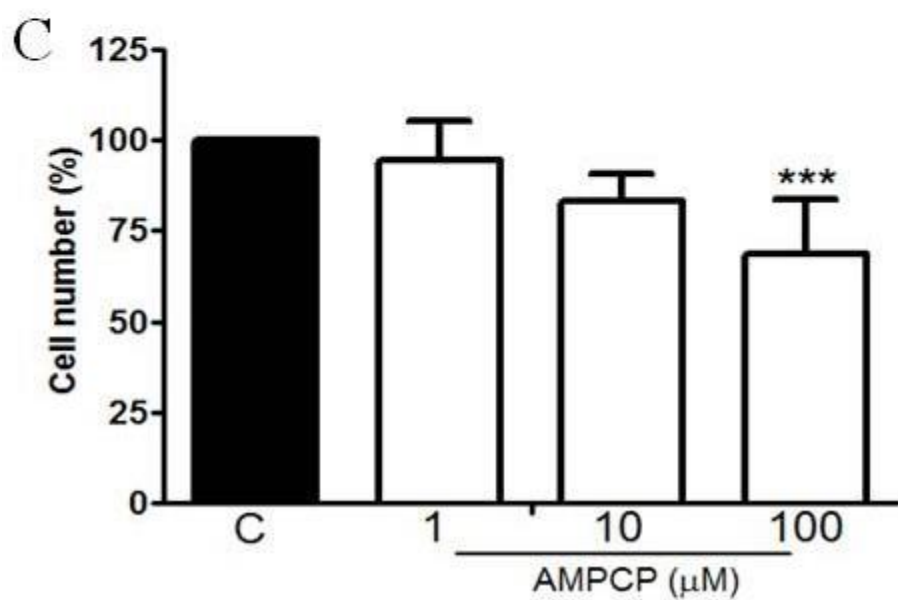
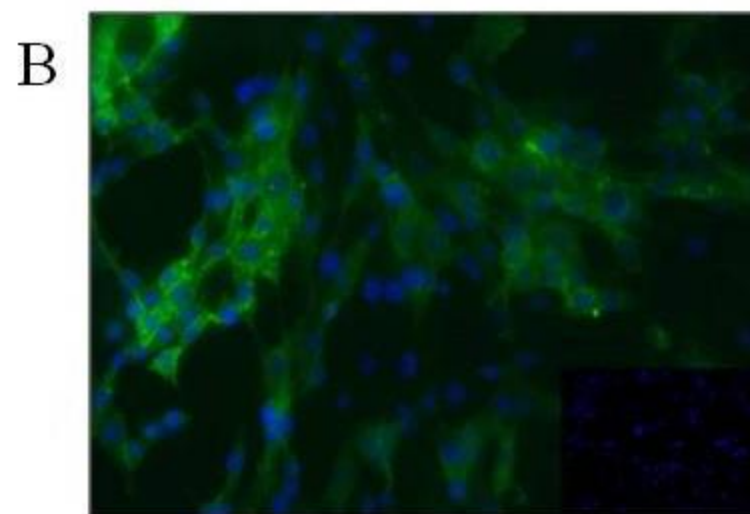
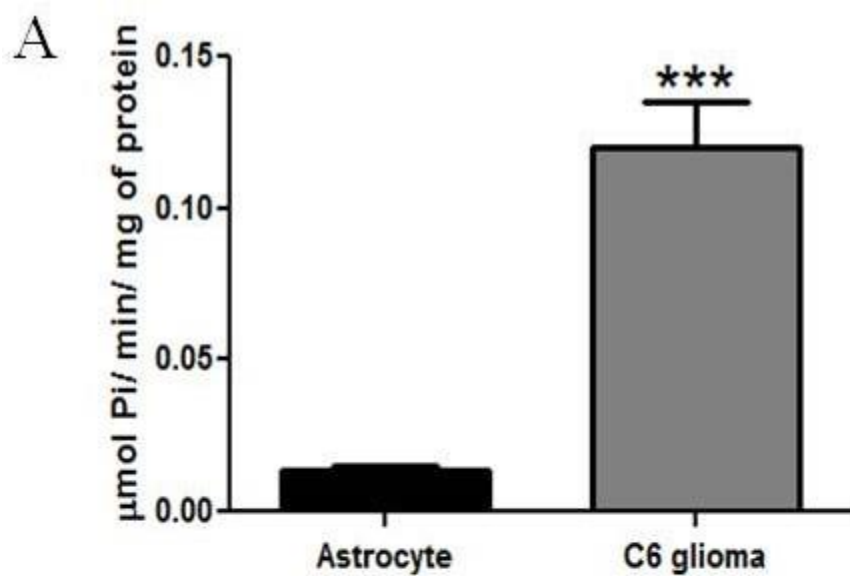
Figure 7. Analysis of NE/siRNA-CD73 treatment on C6 glioma cell viability. Glioma cells were exposed to NE/siRNA-CD73-961 or NE/siRNA-CD73-980 complexes which was prepared at two different +/- charge ratios (+0.1/-; +0.5/-) and the cell viability was assessed by MTT following 48 h of transfection. Untreated or siRNA-GFP exposed cells were considered controls. The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test). *Significantly different from control and siRNA-GFP transfected cells ($P < 0.05$).

Table 1. Small interfering RNA (siRNA) sequences applied in the present study.

siRNA	Sequences	
GFP	sense	5'[Phos]rCrArGrGrCrUrArCrUrUrGrGrArGrUrGrUrArUdTdT3'
	antisense	[Phos] rArUrArCrArCrUrCrCrArArGrUrArGrCrCrUrGdTdT 3'
961	sense	5' [Phos] rGrCrCrArUrCrArArArGrCrArGrArCrArUrUrArArC3'
	antisense	5'[Phos]rUrArArUrGrUrCrUrGrCrUrUrUrGrArUrGrGrCrUrG3'
980	sense	5'[Phos]rArCrCrArGrUrGrGrArGrGrArUrArArArUrUrArG3'
	antisense	5'[Phos] rArArUrUrUrUrArUrCrCrUrCrCrArCrUrGrGrUrUrA3'

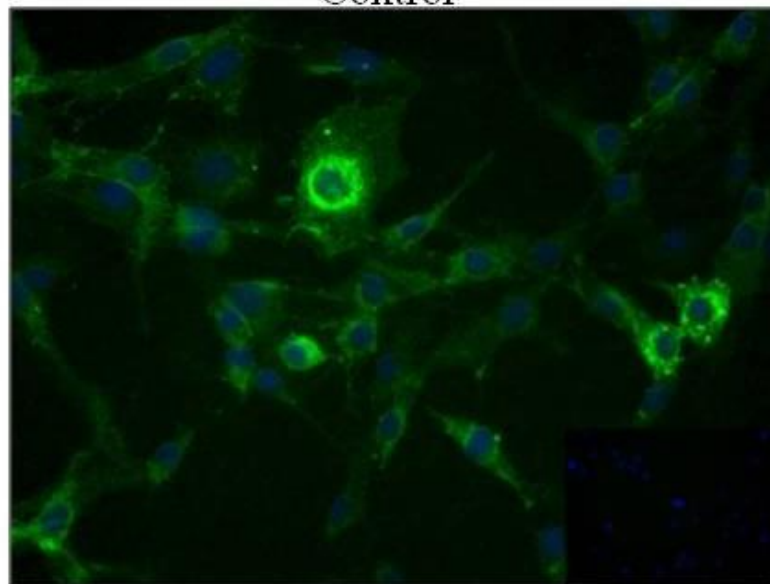
Table 2. Size and zeta potential of NE and NE/siRNA complexes.

siRNA	Charge Ratio	Mean diameter (nm)	Zeta potencial (mv)	Polydispersion Index
NE	-	188.48 ± 25.60	45.5 ± 5.13	0.1412 ± 0.059
NE/siRNA-GFP	+0.1/-	348 ± 12.26	-42.1 ± 4.12	0.302 ± 0.074
	+0.5/-	323.5 ± 105	-32.4 ± 10.14	0.427 ± 0.154
	+2/-	294.5 ± 15.05	-21.5 ± 9.19	0.201 ± 0.024
NE/siRNA- CD73-961	+0.1/-	526.52 ± 82.99	-43.69 ± 9.30	0.67 ± 0.07
	+0.5/-	350.46 ± 80.41	-34.98 ± 17.61	0.54 ± 0.14
	+2/-	272.1 ± 6.724	-32.5 ± 0.96	0.236 ± 0.051
NE/siRNA- CD73-980	+0.1/-	414.8 ± 106.8	-41.7 ± 3.38	0.646 ± 0.093
	+0.5/-	307.4 ± 66.62	-26.7 ± 3.98	0.419 ± 0.175
	+2/-	249.9 ± 16.33	-25.9 ± 8.44	0.164 ± 0.036

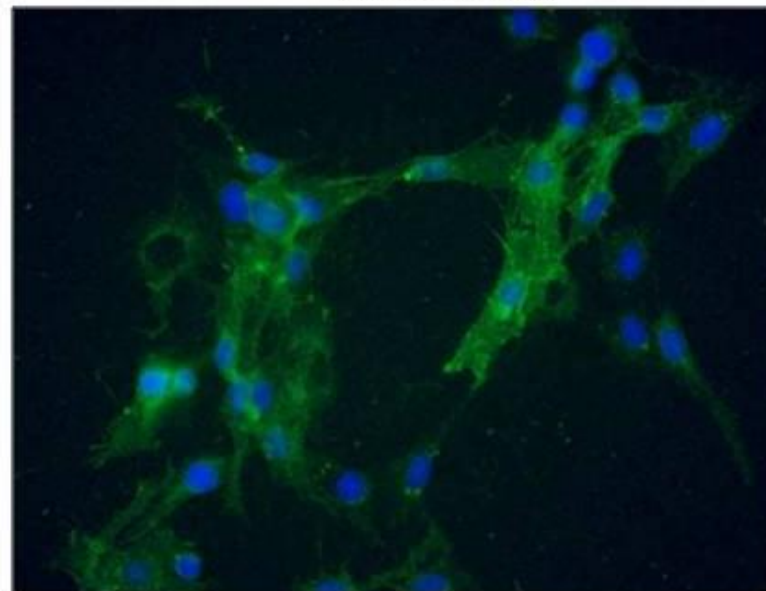


A

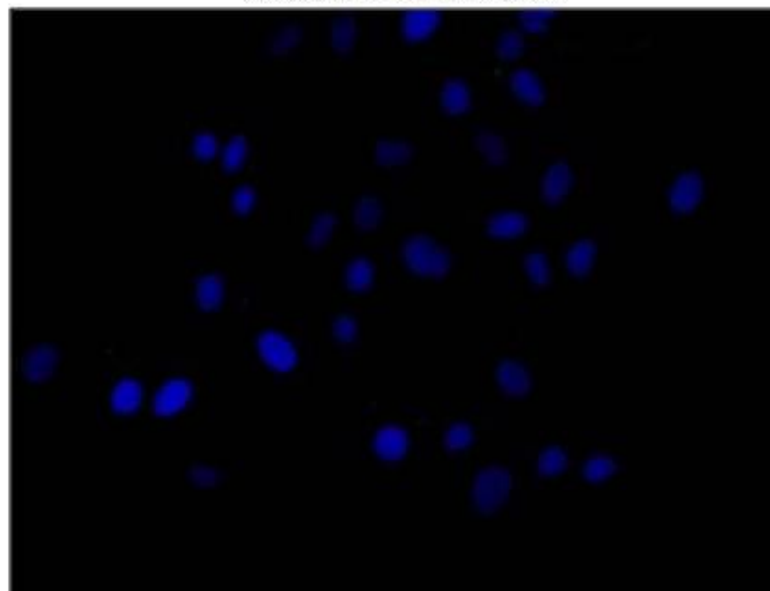
Control



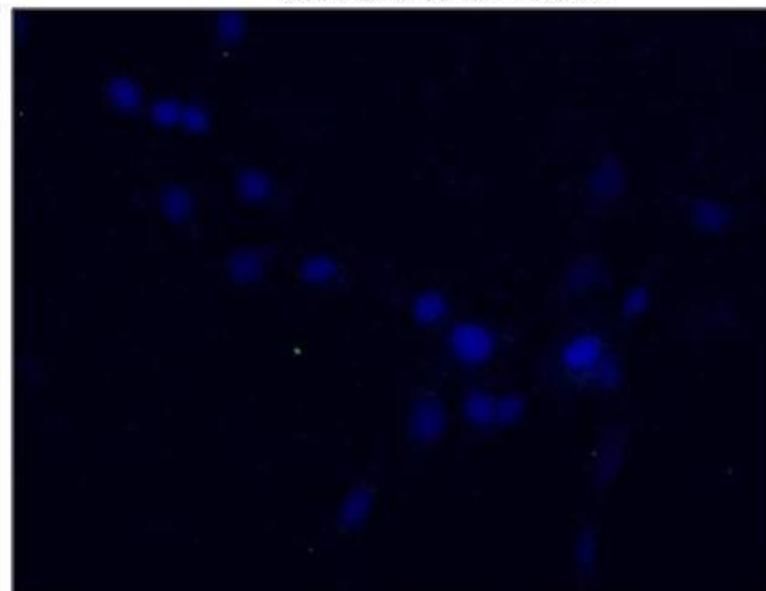
siRNA-GFP



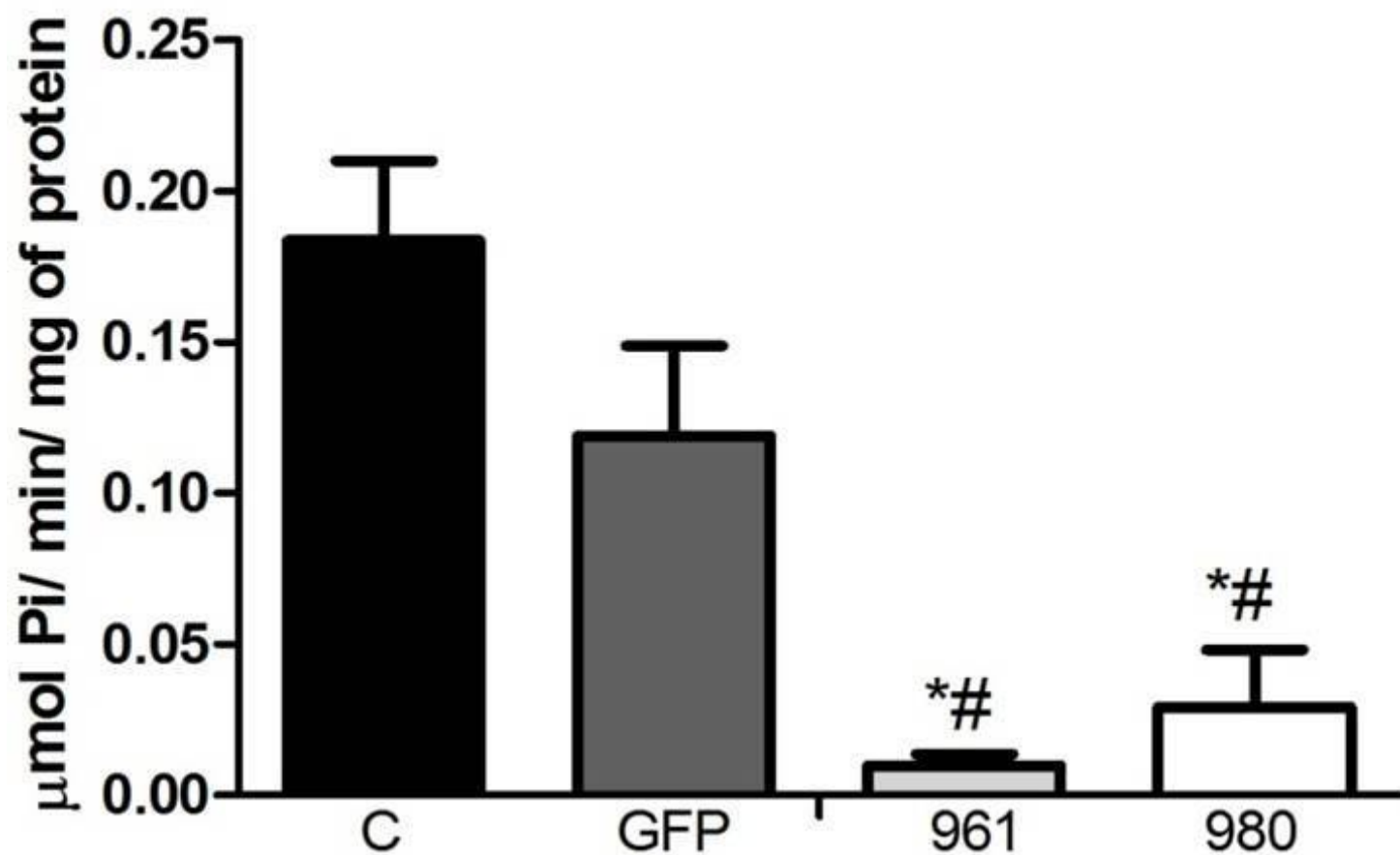
siRNA-CD73-961

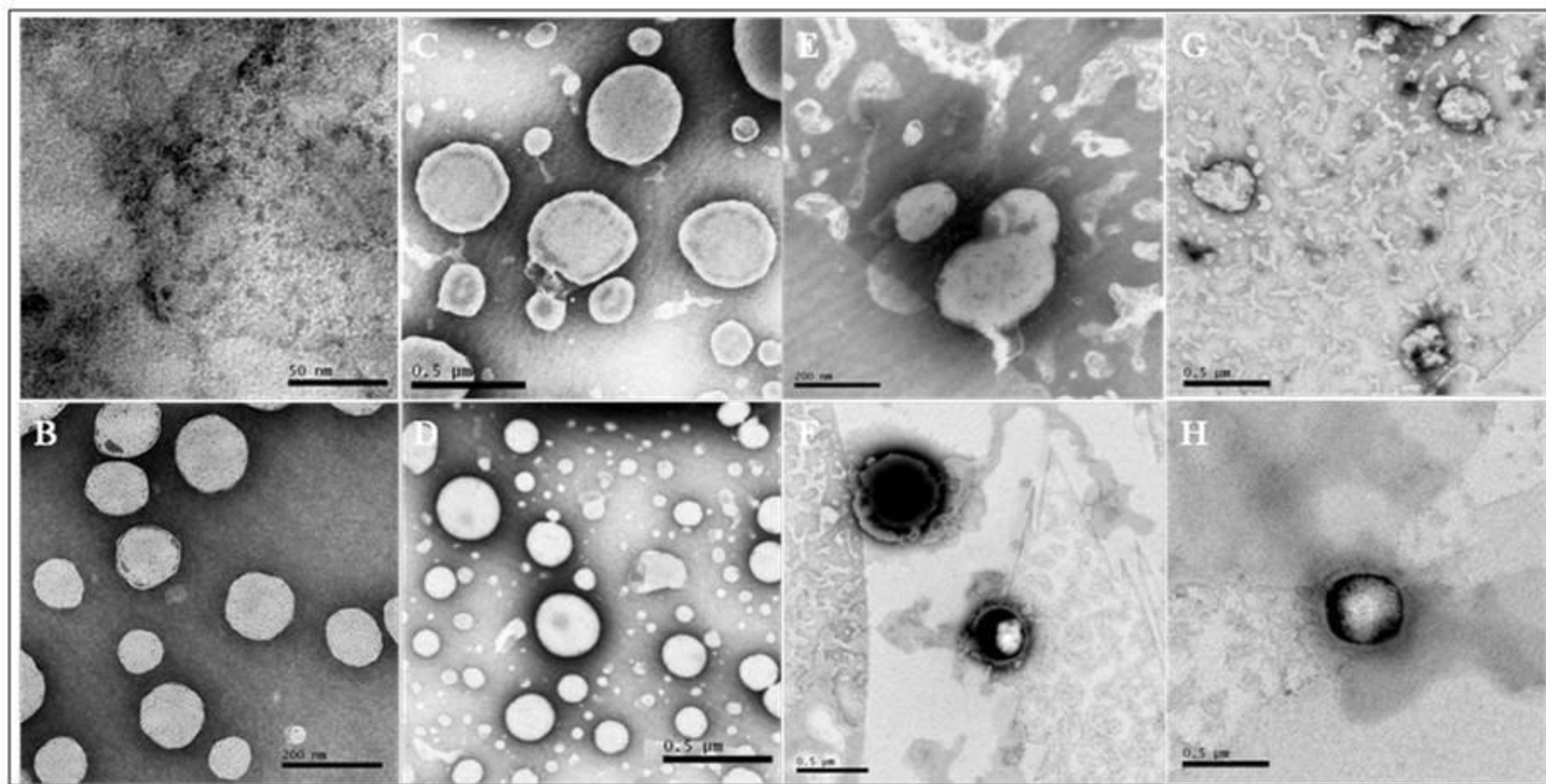


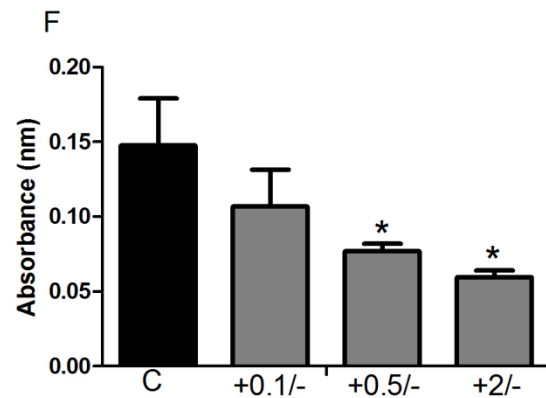
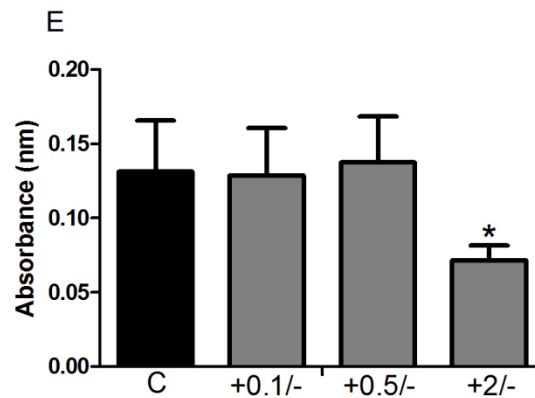
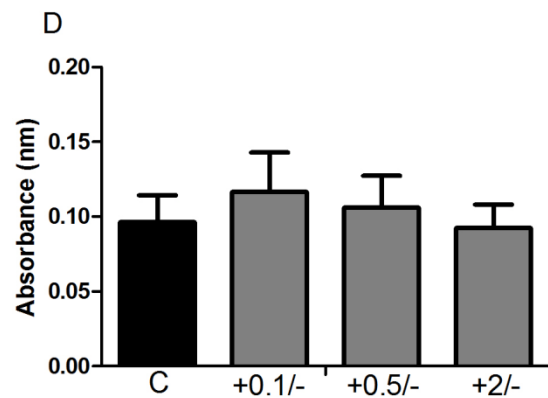
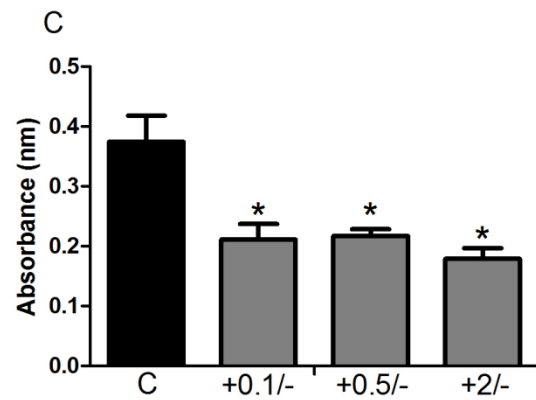
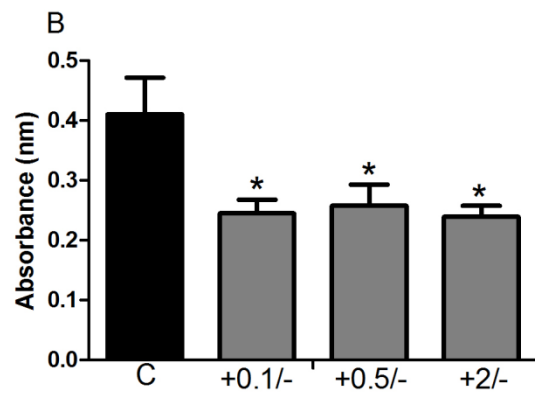
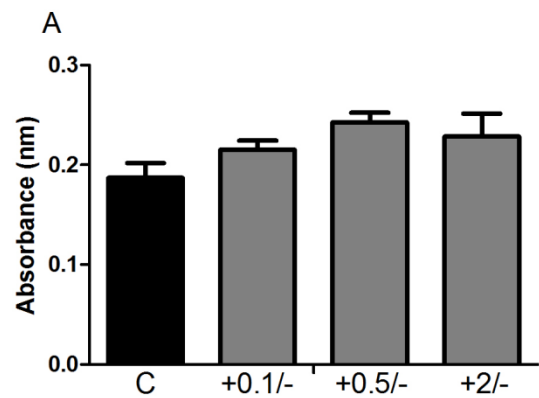
siRNA-CD73-980

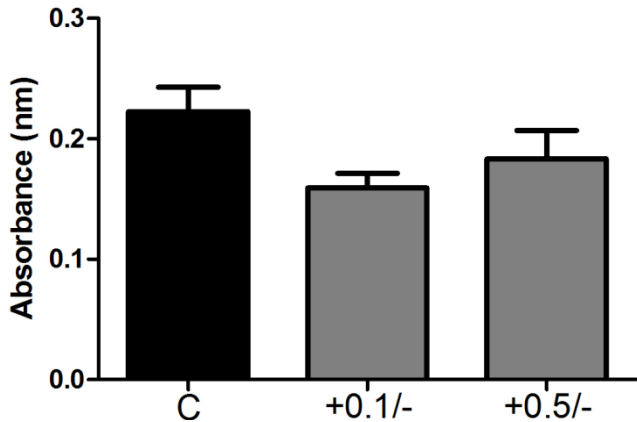


B

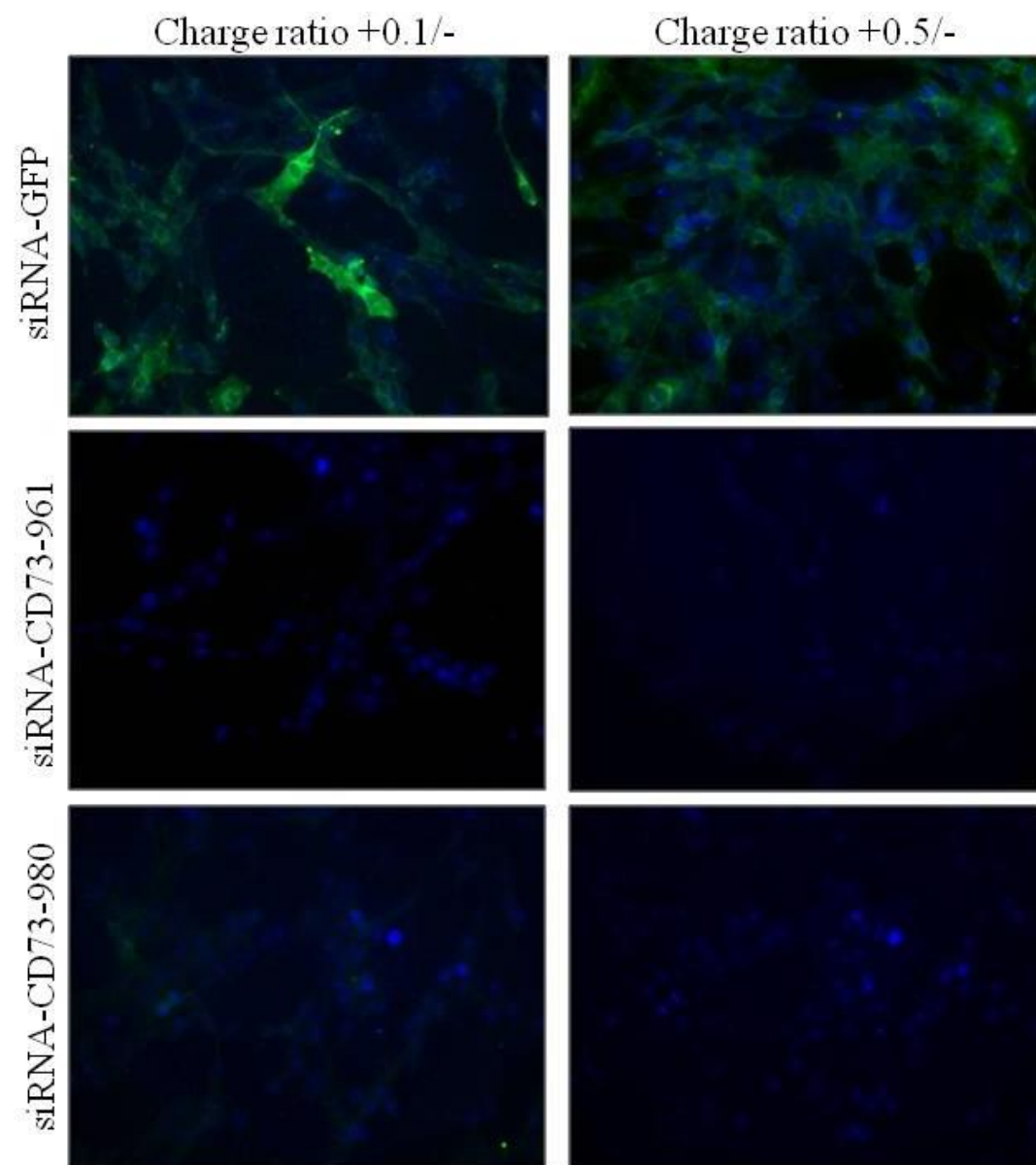




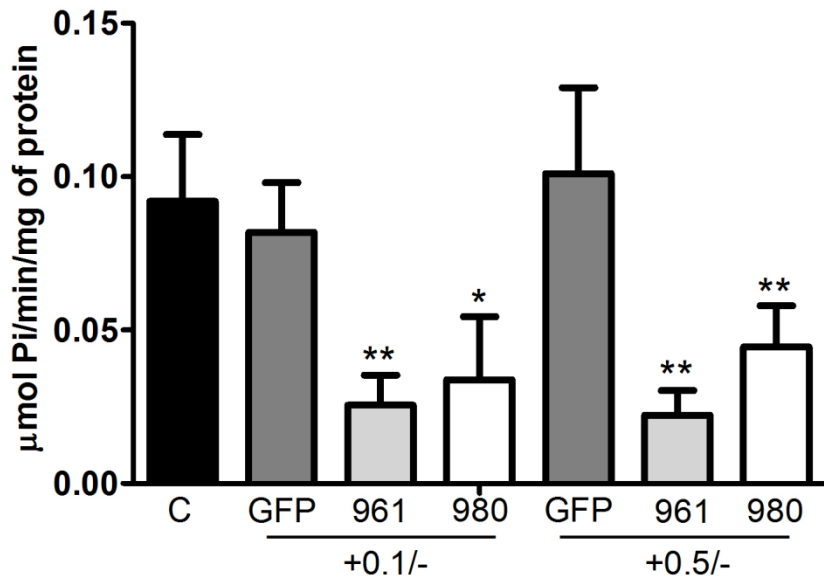


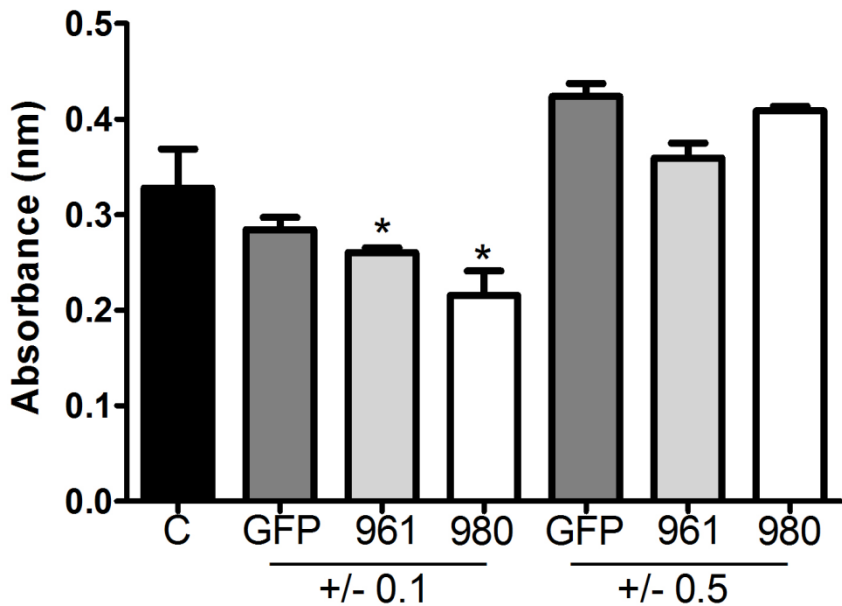


A



C





5. Conclusão

Especificamente, os seguintes objetivos específicos foram alcançados:

Nossos resultados indicaram que o inibidor da 5'-NT/CD73, AMPCP é capaz tanto de diminuir a proliferação celular quanto de reduzir a hidrólise de AMP da linhagem de glioma C6, demonstrando que a enzima é importante para o desenvolvimento tumoral e que, estando inibida, contribuiu para a redução do mesmo.

O complexo formado entre NE e siRNA-GFP (controle do silenciamento) demonstrou que a formulação é segura, conforme evidenciado pela ausência de toxicidade sobre culturas primárias de astrócitos e de linhagem celular de glioma C6.

O complexo formado entre NE-siRNA-CD73 apresentaram características compatíveis com estruturas nano, com relação ao tamanho da partícula, polidispersão e potencial zeta. Além disso, o experimento de microscopia eletrônica de transmissão (MET) indicou que as sequências siRNA se complexaram de forma eficiente às nanoestruturas.

Nossos resultados sugerem uma nova possibilidade de aplicação terapêutica utilizando sequências específicas de siRNA-CD73 complexados com NE para o silenciamento da expressão gênica da enzima 5'-NT/CD73 que, conforme literatura, apresenta expressão aumentada em tumores sólidos. Após a exposição de cultura de glioma C6 aos complexos NE-siRNA-CD73 foi observada uma redução da expressão proteica e da atividade enzimática. Tais achados podem vir a contribuir para o tratamento de gliomas, uma vez que a 5'-NT/CD73 está relacionada com eventos de migração, invasão celular e indução de imunossupressão via produção de adenosina.

Na avaliação da atividade da 5'-NT/CD73 em cultura de células de glioma C6 após o silenciamento utilizando siRNA-CD73, verificamos a redução da hidrólise de AMP, o que sugere uma menor concentração de adenosina no meio extracelular. Sendo essa molécula imunossupressora, acreditamos que ela pode estar envolvida no controle do processo inflamatório e pró-tumoral. Quanto à proliferação celular nas mesmas condições, observamos leve redução desta, sugerindo, portanto que a enzima 5'-NT/CD73 está relacionada com o crescimento tumoral e que seu silenciamento pode vir a se tornar uma alternativa terapêutica utilizada para o tratamento desse tipo de tumor.

Em conclusão esses achados indicam que os complexos siRNA-CD73-NE foram efetivos em silenciar a enzima e que apresentam potencial promissor para o desenvolvimento de um novo medicamento que contribua não apenas para a terapia dos gliomas, mas que também possa ser útil na terapia de inúmeros tumores que apresentem alterações nessa mesma enzima.

6.Referências bibliográficas

AAGARD, L., ROSSI, J.J. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59:75–86. 2007.

ABBRACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G., VERKHRATSKY, A., ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neuroscience*. 32:19-29. 2009.

ABBRACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G., VERKHRATSKY, A., ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neuroscience*. 32:19-29. 2009.

ABBRACCHIO, M.P., SAFFREY, M.J., PÓQUER, V., BURNSTOCK, G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience*. 59: 67-76. 1994.

ALLARD, B., TURCOTTE, M. STAGG, J. CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012:485156. 2012.

BALDWIN, S.A., BEAL, P.R, YAO, S.Y.M., KING, A.E., CASS, C.E., YOUNG, J.D. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *European Journal Physiology*. 447:735–743. 2004.

BEAVIS, P.A., SAGG, J., DARCY, P.K., SMYTH, M.J. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in Immunology*. 33(5):231-7. 2012

BIGONNESSE, F., LÉVESQUE, S.A., KUKULSKI, F., LECKA, J., ROBSON, S.C., FERNANDES, M.J., SÉVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase. *Biochemistry*. May 11;43(18):5511-9. 2004.

BLACKBURN, M.R., KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Advances in Immunology*. 86:1-41. 2005.

BLASS-KAMPMANN, S., KINDLER-ROHRBORN, A., DEISSLER, H., D'URSO, D., RAJEWSKY, M.F. In vitro differentiation of neural progenitor cells from prenatal rat

brain: common cell surface glycoprotein on three glial cell subsets. *Journal of Neuroscience Research*, v.48, n.2, p.95-111, 1997.

BODIN, P., BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochemical Research*. Sep;26(8-9):959-69. 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.

BRAT, D.J.; SCHEITHAUER, B.W.; FULLER, G.N.; TIHAN, T. Newly codified glial neoplasms of the 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: angiocentric glioma, pilomyxoid astrocytoma and pituitaryoma. *Brain pathology*. Jul;17(3):319-24. 2007.

BRUXEL, F., COJEAN, S., BOCHOT, A., TEIXEIRA, H., BORIES, C., LOISEAU, P.M., FATTAL, E. Cationic nanoemulsion as a delivery system for oligonucleotides targeting malarial topoisomerase II. *International Journal of Pharmaceutics*. 416. 402-409. 2011.

BRUXEL, F., LAUX, M., WILD, L.B., FRAGA, M., KOESTER, L.S., TEIXEIRA, F.H. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova*, vol. 35. Nº 9. 1827-1840. 2012.

BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*, pp. 107-118. Eds L. Bolis and R. W. Straub. Raven, New York. 1978.

BURNSTOCK, G. Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. *British Journal of Pharmacology*. Sep;167(2):238-55. 2012.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Science*. 27(3):166-76.2006.

BURNSTOCK, G. Introduction: p2 receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 4:793-803. 2004.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews*. 87 (2): 659-797. 2007.

BURNSTOCK, G. Purine nucleotides. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. 15: 225-235. 1976.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*. 7 (7): 575-590. 2008.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: past, present and future. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Jan;42(1):3-8. Epub 2008 Oct 3. 2009.

CAPPELLARI, A.R., VASQUES, G.J., BAVARESCO, L., BRAGANHOL, E., BATTASTINI, A.M. Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion. *MOLECULAR AND CELL BIOCHEMISTRY*. 359(1-2):315-22. 2012

CHEN, R.; ALVERO, A.B.; SILASI, D.A.; STEFFENSEN, K.D.; MOR, G. Cancers take their Toll—the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene*. 27, 225–233. 2008.

CLAYTON, A., AL-TAEI, S., WEBBER, J., MASON, M.D., TABI, Z. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *Journal of immunology*. 187(2):676-83. 2011

DAI, C.; HOLLAND, E.C. Glioma models. *Biochimica et Biophysica Acta* 1551:M19-M27. 2001.

DEMUTH, T.; BERENS, M.E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *JOURNAL NEURO ONCOLOGY*. 70(2):217-28.2004

DI VIRGILIO, F. Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 81:59–63. 2000.

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

FRAGA, M., BRUXEL, F., LAGRANHA, V.L., TEIXEIRA, H.F., MATTE, U. Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2011.

FREDHOLM, B.B., IJZERMAN, A.P., JACONSON, K.A., KLOTZ, K.N. Linden J. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacology Reviews*. 53 (4), 527-52. 2001.

FRIEDMANN-MORVINKI, D., BUSHONG, E.A., KE, E., SODA, Y., MARUMOTO, T., SINGER, O., ELLISMAN, M.H., VERMA, I.M. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*. Nov 23;338(6110):1080-4.2012.

FULLER, G.N.; SCHEITHAUER, B.W. The 2007 Revised World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System: newly codified entities. *Brain Pathology*. Jul;17(3):304-7.2007

GAO, L., LIU, X.L., LI, X.R. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *International Journal of Nanomedicine*. 6:1017-25. 2011.

GODING, J.W., GROBBEN, B., SLEGERS, H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica and biophysica Acta*, v.1638, n.1, p.1-19, 2003.

GRAY, J.H., OWEN, R.P., GIACOMINI, K.M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *European Journal of Physiology*. 447:728–734. 2004.

GUO, B., ZHANG, Y., LUO, G., LI, L., ZHANG, J. Lentivirus-mediated small interfering RNA targeting VEGF-C inhibited tumor lymphangiogenesis and growth in breast carcinoma. *Anatomical Record (Hoboken)*. May. 292(5):633-639. 2009.

GUO, C.; PIROZZI, C.J.; LOPEZ, G.Y.; YAN, H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas: mechanisms, biomarkers and therapeutic target. *Current Opinion Neurology*. Dec;24(6):648-52. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144(5):646-74. 2011.

HASKO, G., PACHER, P., BLANDIZZI, C., ANTONIOLI, L. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature Reviews*. Vol 13.2013.

HEDDLESTON, J.M., LI, Z., MCLENDON, R.E., HJELMELAND, A.B., RICH, J.N. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*. Oct 15;8(20):3274-84. 2009.

HEGI, M.E.; LIU, L.; HERMAN, J.G.; STUPP, R.; WICK, W.; WELLER, M.; MEHTA, M.P.; GILBERT, M.R. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of Clinical Oncology*. Sep 1;26(25):4189-99. 2008.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. www.inca.gov.br Acesso em: 13/7/13.

IWAKI-EGAWE S., WATANABE, Y., FUJIMOTO, Y. CD26/dipeptidyl peptidase IV does not work as an adenosine deaminase-binding protein in rat cell. *Cellular Immunology*. 178(2), 180-186. 1997.

KAEASHIMA Y, TOSHIRO N, NINOMUYA H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96: 2157-2162, 2000.

KALOSHI, G.; PSIMARAS, D.; MOKHTARI, K.; DEHAIS, C.; HOUILLIER, C.; MARIE, Y.; LAIGLE-DONADEY, F.; TAILLIBERT, S.; GUILLEVIN, R.; MARTIN-DUVERNEUIL, N.; SANSON, M.; HOANG-XUAN K.; DELATTRE, J.Y.; Supratentorial low-grade gliomas in older patients. *Neurology*. Dec 15;73(24):2093-8. 2009.

KANEDA, M.M., SASAKI, Y., LANZA, G.M., MILBRANDT, J., WICLINE, S.A. Mechanisms of Nucleotide Trafficking during siRNA Delivery to Endothelial Cells using Perfluorocarbon Nanoemulsions. *Biomaterials*. April; 31(11):3079-3086. 2010.

KOSZALKA, P., OZUYAMAN, B., HUO, Y., ZERNECKE, A., FLOGEL, U., BRAUN, N., BUCCHEISER, A., DECKING, U.K., SMITH, M.L., SEVIGNY, J., GEAR, A., WEBER, A.A., MOLOJAVVI, A., DING, Z., WEBER, C., LEY, K., ZIMMERMANN, H., GODECKE, A., SCHRADER, J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circulation Research*. 95: 814-821. 2004.

LAZAROWSKI, E.R., BOUCHER, R.C., HARDEN, T.K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular Pharmacology*. Oct;64(4):785-95.2003.

LI, S.; YAN,C.; HUANG, L.; QIU, X.; WANG, Z.; JIANG,T. Molecular prognostic factors of anaplastic oligodendroglial tumors and its relationship: a single institutional review of 77 patients from China. *Neuro Oncology*. Jan;14(1):109-16. 2012.

LIMA, F.R.S.; KAHN, S.A.; SOLETTI, R.; BIASOLI, D.; ALVES, T.; FONSECA, A.C.C.; GARCIA, C.; ROMÃO, L.; BRITO, J.; AFONSO, R.H.; FARIA, J.; BORGES, H.; MOURA-NETO, V. Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1826(2):338-49. 2012.

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.

LUDWING, H.C., RAUCH, S., SCHLLOCK, K., MARKAKIS, E. Expression of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. *Anticancer res* 19(3A), 1747-52. 1999.

MALISZEWSKI, C.R., DELESPESE, G.J., SCHOENBORN, M.A., ARMITAGE, R.J., FANSLOW, W.C., NAKAJIMA, T., BAKER, E., SUTHERLAND, G.R., POINDEXTER, K., BIRKS, C. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *Journal Immunology*. 153(8): 3574-3583. 1994.

MARCELO MONTE MOR RANGEL. Interferencia da eletroporação sobre a expressão de conexinas. 2011. Tese – Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo.

MARTINI, E., CARVALHO, E., TEIXEIRA, H. Adsorção de Oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. *Química Nova*, vol 30. Nº4. 930-934. 2007.

MARTINI, E., FATTAL, E., OLIVEIRA, M.C., TEIXEIRA, H. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 352. 280-286. 2008.

MEGHJI, P., PEARSON, J.D., SLAKEY, L.L. Kinetics of extracellular ATP hydrolysis by microvascular endothelial cells from rat heart. *Biochemistry Journal*. Jun 15;308 (Pt 3):725-31. 1995.

MORRONE, F.B., JACQUES-SILVA, M.C., HORN A.P., BERNARDI. A., SCHWARTSMANN, G., RODNIGHT, R., LENZ, G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *Journal of Neuro-oncology*. 64(3): 211- 218. 2003.

MOUSSEAU, M., CHAUVIN, C., NISSOU, M.F., CHAFFANET, M., PLANTAZ, D., PASQUIER, B., SCHAEERER, R., BENABID, A. A study of the expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumours. *European Journal Cancer*. 29A(5):753-9. 1993.

NAKAZATO, Y. The 4th Edition of WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System published in 2007. *No Shinkei Geka*. Jun;36(6):473-91. 2008.

NAM, H.Y., PARK, J.H., KIM, K., KWON, I.C., JEONG, S.Y. Lipid-Based Emulsion System as Non-Viral Gene Carriers. *Archives of Pharmacal Research*. Vol. 32. Nº5. 639-646. 2009.

ONGAKI, H.; KLEIHUES,P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Ameriacam Journal of Pathology*. May;170(5):1445-53. 2007.

PEREZ, A.P., COSAKA, M.L., ROMERO, E.L., MORILLA, M.J. Uptake and intracellular traffic os siRNA dendriplexes in glioblastoma cells and macrophages. *International Journal of Nanomedicine*. (6)2715-2728. 2011.

PERSANO, L.; RAMPAZZO, E., BASSO, G.; VIOLA, G. Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochemical Pharmacology*. Mar 1;85(5):612-22. 2013.

PICCIRILLO, S.G., BINDA, E., FIOCCO, R., VESCOVI, A.L., SHAH, K. Brain cancer stem cells. *Journal of molecular medicine, Berlim*, v.87, n.11, p.1087-1095, 2009.

PICCIRILLO, S.G.; VESCOSI, A.L. Brain tumour stem cells: possibilities of new therapeutic strategies. *Expert Opinion Biology Therapeutics* 7(8):1129-35.2007.
Portaria do Ministério da Saúde nº599 de 26 de junho de 2012.

RESTA, R., YAMASHITA, Y., THOMPSON, L.F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunology Review*. 161: 95-109. 1998.

ROBSON, C.R., SÉVIGNY, J., ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Purinergic Signalling*, v. 2, p. 409-430. 2006.

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

SAJED, R., SPYCHALA, J., SKLADANOWSKI, A.C. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Research* 16(3):213-22. 2006.

SANAI, N.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; BERGER, M.S. Neural stem cells and the origin of gliomas. *New England Journal of Medicine*. 353:811, 2005.

SARKIS, JJF et al. ATP diphosphohydrolases: an overview. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. V.47, p. 131-136, 1995.

SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J.N. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Annals New York Academy of Science*. 1142:108-32. 2008.

SELTZER, M.J., BENNETT, B.D., JOSHI, A.D., GAO, P., THOMAS, A.G., FERRARIS, D.V., TSUKAMOTO, T., ROJAS, C.J., SLUSHER, B.S., RABINOWITZ, J.D., DANG, C.V. Riggins GJ. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Research*. Nov 15;70(22):8981-7. 2010.

SHU, Y., SHARMA, A., RAJABI, F.H., SHU, D., LEGGAS, M., EVERS, E.M., GUO, P. Stable RNA nanoparticles as potential new generation drugs for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Nov 22. pii: S0169-409X (13) 00265-2. 2013.

SILVA, C., MARTINI, E., TAVARES, G., SILVEIRA, T., OLIVEIRA, M.C., TEIXEIRA, H. Caracterização físico-química de Nanoemulsoes catiônicas como sistemas de liberação de Oligonucleotídeos. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 25 (1): 17-21. 2006.

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

STAGG, J., DIVISEKERA, U., DURET, H., SPARWASSER, T., TENG, M.W., DARCY, P.K., SMYTH, M.J. CD73- deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Research*. 71(8):2892-900. 2011.

STAGG, J., SMYTH, M.J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. 29(39):5346-58. 2010.

STUPP, R.; WEBER, D.C. The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma. *Onkologie*. Jun;28(6-7):315-7. Epub Jun 2. 2005.

TEIXEIRA, H., DUBERNET, C., PUISIEUX, F., BENITA, S., COUVREUR, P. Submicron cationic emulsions as a new delivery system for oligonucleotides. *Pharmaceutical Research*, vol 16. Nº1. 1999.

THORN, J.A., JARVIS, S.M. Adenosine Transporters. *General Pharmacology*. Vol 27. Nº4. 613-620, 1996.

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*. *Biochemistry Journal*. 278: 199-202. 1991.

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*. *Biochemistry Journal*. 278: 199-202. 1991.

VOUGIOUKAS, V.I.; OMRAN, H.; GLASKER, S., VAN VELTHOVEN, V. Far lateral supracerebellar infratentorial approach for the treatment of upper brainstem gliomas: clinical experience with pediatric patients. *Child's Nervous System*. 21(12):1037-41. 2005.

VOUSDEN, K.H. Functions of p53 in metabolism and invasion. *Biochemical Society Transactions*. Jun;37(Pt 3):511-7. 2009.

WANG, K., WU, X., WANG, J., HUANG, J. Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine*. (8) 899–908. 2013.

WINK, M.R., BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A.S., LENZ, G., ZERBINI, L.F., LIBERMANN, T.A., SÉVIGNY, J., BATTASTINI, A.M., ROBSON, S.C. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2(NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience*.138(2): 421-432. 2006.

WINK, M.R., LENZ, G., BRAGANHOL, E., TAMAJUSUKU, A.S., SCHWARTSMANN, G., SARKIS, J.J., BATTASTINI, A.M. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Letters*. 198(2): 211-218. 2003.

XU, Z., ZHAO, L., ZHU, L.Y., HE, M., ZHENG, L., WU, Y. MicroRNA-17, 20a regulates the proangiogenic function of tumor-associated macrophages via targeting hypoxia-inducible factor 2 α . *PLoS One*. Oct 23;8(10):e77890. 2013.

YAN, W.; ZHANG, W.; JIANG, T. Oncogene addiction in gliomas: implications for molecular targeted therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. May 17;30:58. doi: 10.1186/1756-9966-30-58. 2011

YEGUTKIN, G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*. May;1783(5):673-94. 2008.

YEGUTKIN, GG, HENTTINEN, T, SAMBURSKI SS, SPYCHALA J, JALKANEN S. The evidence for two opposite ATP-generating and ATP consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Bochemical Journal*. 367: 121-128, 2002.

ZHANG B. CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncolmunology* 1:1, 67-70. 2012.

ZHANG B. CD73: A novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 70(16): 6407–6411.2010.

ZHI, X., WANG, Y., ZHOU, X., YU, J., JIAN, R., TANG, S., YIN, L., ZHOU, P. RNAi-mediated CD73 suppression induces apoptosis and cell-cycle arrest in human breast cancer cells. *Cancer Science*. 101(12):2561-9. 2010.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *The biochemical journal*, v.285, p.345-365, 1992.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp*. 276:113-28; discussion 128-30, 233-7, 275-81. 2006.

ZIMMERMANN, H., ZEBISCH, M., STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic signaling*, v.8, n.3, p.437-502, 2012.

ZIMMERMANN, H.G., NEUNEIER, R., GROTHMANN, R. Multi-agent modeling of multiple FX-markets by neural networks. *IEEE transactions on neural networks*, v.12, n.4, p.735-743, 2001.