

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO SOBRE AS ATIVIDADES  
NUCLEOTIDÁSICAS EM LINFÓCITOS E SORO DE RATOS  
SUBMETIDOS AO MODELO TUMORAL DE WALKER 256**

VANESSA BLEY RIBEIRO

Orientadores:

PROF. DR. DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA

PROF. DR. JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS (*in memorian*)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
para obtenção do título de mestre

Porto Alegre, 2008

Realmente é desnecessário questionarmos se a vida tem ou não sentido.

Ela tem o sentido que nós damos a ela.

## **Agradecimentos**

Ao pessoal do ratário, sempre solícitos, agradeço por toda a dedicação e por todos os ratinhos concedidos nesse período. Um grande abraço ao Valeri, ao Marlon, à Fátima, à Taís, à Tina e à dona Marina;

À Cléia, querida, sempre bem-humorada, agradeço pela boa vontade interminável, sempre dando um jeito de encontrar as soluções pra tudo;

À Déia, pelo ingresso na vida científica e pelos tantos ensinamentos;

À Agnes, à Adrine, à Lucimara, à Vanessa, ao Émer, ao Jean e a todo o pessoal dos laboratórios 22 e 24, que foram parte da minha família durante todos esses anos. Obrigada pela convivência maravilhosa!

À Denise e ao Vini por todo esforço e colaboração. Valeu por toda ajuda;

À Fê, querida, que estava sempre pronta, agradeço por toda dedicação e empenho e, principalmente pela paciência que sempre teve comigo;

À Dani, amigona, parceria sempre! Obrigada pelo carinho, pela grande ajuda, pelos desabafos e pela amizade;

À Sandroca, por ser essa pessoa tão admirável! Teu alto-astrol e a tua alegria foram contagiantes! Obrigada pelos conselhos, pelo exemplo e perseverança e, principalmente pela grande amizade!

À Bárbara e à Cris, minhas amigas do coração, de todas as horas, que foram um pouco mãe, um pouco irmãs e até orientadoras!! Obrigada por toda a amizade e dedicação de sempre, pelos chimas, pelos choros, pela torcida firme e por sempre darem um jeito de aliviar minhas angústias! Agradeço de coração a vocês, meus anjos da guarda!!

À Luci, minha grande amiga, minha companheira e confidente. Agradeço por toda lealdade, pelas tantas lembranças (e que tantas!!) não me deixando esquecer nunca de nada, pela companhia gostosa e animada das nossas idas e vindas e por ter deixado os meus dias tão mais felizes. Obrigada por tudo, te adoro demais!

À Carla, que me socorreu e me mostrou a luz quando o túnel parecia tão escuro. De coração agradeço por todo apoio e incentivo que me destes. Obrigada por tudo!

Ao professor Diogo, por toda a sensibilidade e por ter feito o máximo pra aliviar nossas angústias neste período tão difícil.

Ao Prof. Sarkis que eu sei que está olhando e torcendo muito por mim. Obrigada, professor, pela oportunidade maravilhosa, por todo carinho, pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha e pelas intermináveis brincadeiras! Foi muito bom...

Ao Marlos, por ter sido o meu porto seguro durante esses dois anos. Te agradeço, meu amor, por toda paciência, pelo apoio, pelo divertimento e companheirismo, mas principalmente, por todo teu carinho;

Aos meus pais amados, que dão sentido à minha vida, obrigada pelo amor incondicional e pela família maravilhosa que vocês sempre me deram!

E enfim, a Deus, meu Pai bondoso, pelas forças infinitas e por segurar a minha mão sempre. Obrigada, obrigada, obrigada!

## Sumário

I. RESUMO.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1. Ácido acetilsalicílico.....	4
1.2. Tumor de Walker 256.....	5
1.3. Sinalização purinérgica.....	6
1.4. Receptores purinérgicos.....	7
1.5. ATP.....	8
1.6. Adenosina.....	10
1.7. Nucleotidasas.....	11
1.7.1. NTPDases.....	12
1.7.2. NPPs.....	13
1.7.3. 5'-nucleotidase.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. CAPÍTULOS.....	17
3.1. Capítulo 1 – Artigo científico.....	17
3.2. Capítulo 2 – Resultados preliminares.....	43

4. DISCUSSÃO.....	52
4.1. Considerações gerais.....	52
4.2. Ácido acetilsalicílico (AAS) altera a hidrólise dos nucleotídeos da adenina em linfócitos de ratos submetidos ao tumor de Walker 256.....	53
4.3. Ácido acetilsalicílico modula as atividades nucleotidásicas em soro de ratos adultos submetidos ao modelo tumoral de Walker 256.....	57
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS.....	61



## Resumo

Considerando as várias propriedades fisiológicas e patológicas já descritas para os nucleotídeos da adenina, muitos estudos têm sugerido um importante papel destas moléculas no desenvolvimento de tumores. Enquanto o ATP parece ser citotóxico às células tumorais, a adenosina possui uma atividade tumorigênica. Além disso, muitos estudos demonstram o envolvimento dos nucleotídeos na modulação da resposta imune. As ações induzidas pela sinalização purinérgica são reguladas pelas nucleotidasas, que podem estar localizadas nas membranas celulares ou podem apresentar-se de forma solúvel no meio intracelular e/ou extracelular. Pertencem a este grupo de enzimas a família das nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDases), a família das nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (NPPs) e a 5'-nucleotidase. Muitos estudos sugerem que o uso de antiinflamatórios não-esteroidais está associado com a proteção contra o desenvolvimento de muitos tipos de câncer. Neste estudo, nós avaliamos a hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina em linfócitos de ratos adultos submetidos ao modelo tumoral de Walker 256, bem como uma possível modulação do ácido acetilsalicílico (AAS) nas atividades nucleotidásicas em linfócitos e soro de ratos submetidos ao mesmo modelo. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo nas hidrólises de ATP e ADP em linfócitos no décimo dia após a indução tumoral e/ou o tratamento com AAS. Nenhuma alteração na hidrólise do AMP foi observada. A administração de AAS aumentou a hidrólise de ATP e ADP em linfócitos de ratos inoculados com o tumor. Os níveis transcricionais das NTPDases1-3 foram significativamente aumentados na presença do tumor e diferentemente afetados pela administração do AAS. No soro, a hidrólise do ATP foi alterada pelo AAS apenas no décimo dia de tratamento, enquanto as hidrólises de ADP e AMP foram alteradas no sexto e no décimo dias. A administração de AAS aos animais inoculados com o tumor promoveu uma redução significativa nas hidrólises de ATP e AMP no sexto dia. A partir desses resultados, podemos concluir que a modulação dos níveis dos nucleotídeos em linfócitos pareceu não contribuir para os efeitos benéficos do AAS no câncer. Por outro lado, na circulação, um efeito potencialmente benéfico do AAS sobre o tumor foi observado no período inicial de tratamento. Assim, é possível sugerir, que o AAS possa desempenhar um importante papel na prevenção da invasão do tumor, parecendo não ser mais efetivo após sua instalação e desenvolvimento no hospedeiro.



## Abstract

In addition to the various physiological and pathological properties already known for adenine nucleotides, an important role of these molecules in tumor development has been proposed. Whereas ATP has been shown to be cytotoxic for tumoral cells, adenosine has been shown to possess a tumor-promoting action. Moreover, many studies have also demonstrated the nucleotide involvement in immune response modulation. The actions induced by purinergic signaling are regulated by nucleotidases, that are located on cell membrane or they are present in soluble forms on the intracellular and/or extracellular milieu. These enzymes comprise the nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (NTPDases), the nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase family (NPPs) and the 5'-nucleotidase. Numerous studies have suggested that the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs can protect against the development of cancer. In the present study, we evaluated the extracellular adenine nucleotide hydrolysis from rat lymphocytes submitted to the Walker 256 tumor model and a possible modulation of acetylsalicylic acid on nucleotidase activities from rat lymphocytes and rat blood serum submitted to the same model. Our results demonstrated a significant increase on ATP and ADP hydrolysis from rat lymphocyte ten days after the tumor induction and/or the ASA treatment. No alterations were observed to AMP hydrolysis. The ASA administration increased ATP and ADP hydrolysis from tumor-bearing rat lymphocytes. The transcriptional levels of NTPDases1-3 were significantly increased in the tumor presence and differently affected by ASA administration. In the blood serum, the ATP hydrolysis was altered by ASA only at 10 days of treatment whereas the ADP and AMP hydrolysis were altered at 6 and 10 days. The ASA administration in tumor-bearing rats promoted a significant reduction on ATP and AMP hydrolysis at 6 days of treatment. Considering our results, it is possible to conclude that modulation on nucleotide levels in lymphocytes seems not contribute to beneficial effects of ASA in cancer. By other hand, in the circulation, a potential beneficial effect of ASA on tumor was observed in the initial period of treatment. Thus, it is possible to suggest that ASA could have an important role in the tumor invasion, but does not seem to be effective after its installation and development in the host.

## Lista de abreviaturas

AAS – ácido acetilsalicílico

AMP – adenosina 5'-monofosfato

ADP – adenosina 5'-difosfato

ATP – adenosina 5'-trifosfato

CD39 – antígeno de ativação celular linfóide

CD73 – proteína de superfície de linfócitos

COX - ciclooxigenase

NTPDase – nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

NPP – nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

IL - interleucina

PKC - proteína kinase C

P2X – receptor purinérgico ionotrópico

P2Y – receptor purinérgico metabotrópico

Pi – fosfato inorgânico

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (do inglês “*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*”)

UDP – uridina 5'-difosfato

UTP – uridina 5'-trifosfato

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Ácido acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico (AAS), pertencente à classe dos salicilatos, é um fármaco que possui propriedades analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias. Sua ação primária é a inativação irreversível da enzima cicloxigenase (COX), que catalisa a primeira fase da biossíntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Até agora, são descritas duas isoformas dessa enzima, conhecidas como cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2), sendo a primeira constitutiva, responsável por funções fisiológicas protetoras da mucosa gástrica e parênquima renal, enquanto a segunda existe em processos inflamatórios e é induzida por fatores de crescimento existentes no soro, interleucinas, lipopolissacarídeos bacterianos e promotores tumorigênicos (Fuchs et al., 2004).

Após a introdução do seu uso clínico, o AAS tem sido largamente utilizado no tratamento de muitas doenças. Além da sua atividade antiinflamatória bem conhecida, outras propriedades como modulação do crescimento tumoral e atividade antiangiogênica têm sido sugeridas. O interesse no AAS como uma droga promissora na área da oncologia é basicamente devido ao desenvolvimento de pesquisas que mostram a sua importância na inibição de processos de carcinogênese em modelos *in vitro* e *in vivo* (Seed et al., 1997; Masahiko et al., 1998; Rao & Reddy, 2004) e produção de fatores de invasão celular (Jiang et al., 2001). Além disso, evidências epidemiológicas relacionam a ingestão de antiinflamatórios não-esteroidais (AINES), como a aspirina, com uma baixa incidência de carcinoma coloretal (Rossemberg et al., 1991). O AAS também parece intervir na neoangiogênese, processo fundamental no crescimento e disseminação de neoplasias

(Masahiko et al., 1998), bem como na indução de apoptose em diferentes modelos tumorais (Dikshit et al, 2006; Wang & Dubois, 2006). Estes efeitos protetores podem resultar da inibição das isoformas da COX que têm mostrado ligação com carcinogênese e crescimento tumoral (Van & Ristimaki, 2001). Entretanto, o mecanismo exato pelo qual o AAS reduz o desenvolvimento e risco de câncer ainda não está totalmente esclarecido.

## **1.2. Tumor de Walker 256**

O tumor de Walker 256 é uma neoplasia de crescimento espontâneo, originado da glândula mamária de uma rata albina prenhe, que foi classificado histologicamente como carcinoma. Posteriormente, testes de transplantabilidade mostraram a capacidade de fragmentos do tumor original crescerem em ratos receptores (Earle, 1935). As características de transplantabilidade deste tumor, bem como técnicas de criopreservação e de cultura de tecidos, permitiram manter esta linhagem até a atualidade, sendo descritas variantes morfológicas como sarcoma, carcinosarcoma e carcinoma (Iwama et al., 1973).

O tumor de Walker 256 tem sido amplamente utilizado nos estudos de fisiopatologia do câncer (Toal et al., 1960; Morrison et al., 1971; Guaitani et al., 1982; Rettori et al., 1995; Buffon et al., 2007) e diversas vias de inoculação foram utilizadas para administração destas células, como a via subcutânea e a via intraperitoneal (Iwama et al., 1973). Quando a via subcutânea é utilizada, há o desenvolvimento de tumores sólidos, firmes, encapsulados e de forma arredondada (Earle, 1935; Iwama, 1979). Por outro lado, a inoculação das células através do peritônio, ocasiona o desenvolvimento da forma ascítica do tumor (Iwama et al., 1973).

### **1.3. Sinalização purinérgica**

Drury e Szent-Györgi, em 1929, descreveram potentes ações para os nucleotídeos e nucleosídeos purínicos, ATP e adenosina, no coração e nos vasos sanguíneos. Mais tarde, foi demonstrado que o ATP poderia ser liberado durante a estimulação de nervos sensoriais, produzindo mudanças no tônus vascular (Holton, 1959). Há alguns anos atrás, Geoffrey Burnstock encontrou no sistema nervoso autônomo um composto que era co-liberado com a noradrenalina pelos nervos simpáticos e também demonstrou que o ATP era liberado na junção neuro-muscular (Burnstock et al., 1970). Esse efeito “adicional” à transmissão colinérgica e noradenérgica, mediado pelos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, foi denominado, então, como sinalização purinérgica (Burnstock, 1972)

Os nucleotídeos extracelulares são importantes moléculas sinalizadoras e exercem seus efeitos biológicos via receptores celulares (purinoreceptores). Os efeitos promovidos por estas moléculas incluem contração do músculo liso, neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC) e periférico, secreção exócrina e endócrina e modulação da função cardíaca. Os nucleotídeos também estão envolvidos nos processos de agregação plaquetária, inflamação e resposta imune, bem como na proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular (Abbracchio & Burnstock, 1998; Burnstock, 2006, Di Virgilio, 2007). Recentemente, foi proposta uma atividade anticâncer para os nucleotídeos da adenina e, desde então, muitos estudos têm sido realizados na busca de novas ferramentas terapêuticas para o tratamento do câncer (Rappaport, 1983; Burnstock, 2006).

## 1.4. Receptores purinérgicos

Os efeitos dos nucleotídeos extracelulares são mediados por ativação de receptores localizados na superfície das membranas celulares, denominados purinoreceptores, os quais são divididos em dois grupos: receptores P1 e receptores P2. Os purinoreceptores do tipo P1 são receptores de adenosina, enquanto os do tipo P2 são ativados por ATP, ADP, UTP e UDP. Os receptores P1 são subdivididos em A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> e transmitem seus sinais via proteína G, podendo tanto estimular (G<sub>s</sub>) quanto inibir (G<sub>i</sub>) a atividade da adenilato ciclase, a enzima que catalisa a formação de AMP cíclico. Os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> estão acoplados à proteína G<sub>s</sub> e ativam a adenilato ciclase, enquanto que os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> estão acoplados à proteína G<sub>i</sub>, inibindo-a (Ralevic & Burnstock, 1998; Czajkowski e Baranska, 2002).

A classificação dos receptores P2 foi inicialmente baseada em critérios farmacológicos (Burnstock & Kennedy, 1985) e posteriormente reforçada a partir de técnicas de clonagem e expressão em sistemas heterólogos (Evans et al., 1995). Estes receptores são subdivididos em duas classes: P2X e P2Y. A família P2X, ligada a um canal iônico, está envolvida na transmissão excitatória rápida e está dividida em sete subtipos (P2X<sub>1-7</sub>). A família P2Y é composta por receptores metabotrópicos acoplados à proteína G, sendo divididos em oito subtipos (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> e P2Y<sub>14</sub>) (Burnstock, 2004).

Considerando a ampla atuação das purinas, suas ações já têm sido descritas através de receptores purinérgicos localizados nas membranas das células imunes, incluindo apoptose, quimiotaxia e adesão celular. Além disso, diferentes subtipos de receptores P2

têm sido identificados em muitos tipos de câncer, tanto em amostras de tecido tumoral de humanos quanto em linhagens celulares (Burnstock G, 2001; White & Burnstock, 2006).

## **1.5. ATP**

Além de seu importante papel no metabolismo celular como fonte energética, o ATP é liberado nos terminais nervosos de diferentes áreas cerebrais (Richardson & Brown, 1987; Fiedler et al., 1992) e atua como o principal neurotransmissor durante a transmissão purinérgica em sistema nervoso autônomo (Burnstock, 1972). Embora o ATP, como molécula sinalizadora, esteja principalmente associado com o sistema nervoso central, esse nucleotídeo desempenha funções igualmente importantes em outros tecidos. Numerosos estudos já demonstraram a sua ligação a diversos fenômenos, tais como, sinalização quimiosensorial, secreção, efeitos cardiovasculares, coagulação sanguínea, fertilidade masculina, dor, desenvolvimento embrionário, imunomodulação, entre outros (Borsellino et al., 2007).

No sistema imune, o ATP extracelular funciona como um “adjuvante natural” que exhibe múltiplos efeitos proinflamatórios, sendo liberado de células lesadas como um indicador de trauma e destruição tecidual. Assim, o ATP atua como um sinal que ativa o sistema imune (Borsellino et al., 2007).

Além das respostas fisiológicas, este nucleotídeo também pode desencadear respostas patológicas dependendo do receptor ativado. Processos, como a proliferação celular, devem-se à ativação dos receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub>, enquanto a ativação do receptor P2X<sub>7</sub> está relacionada com morte celular (Harada et al., 2000).

A capacidade citotóxica dos nucleotídeos extracelulares sobre linhagens celulares transformadas e não-transformadas tem sido alvo de muito interesse. A indução de apoptose parece exercer uma importante função na atividade anticâncer descrita para o ATP (Abbraccio & Burnstock, 1998). Alguns autores têm proposto que este nucleotídeo permeia a membrana celular e induz apoptose em vários sistemas de células tumorais *in vitro*, além de indicarem o seu envolvimento na morte das células tumorais mediada por linfócitos-T ativados (Di Virgilio et al., 1990). Com base nesses estudos, o ATP pode ser considerado um mediador citotóxico, uma vez que pode ser secretado por linfócitos - ativados por algum estímulo - ao passo que os mesmos, para se protegerem da morte celular induzida por ATP, aumentam a expressão de nucleotidases na membrana celular (Filippini et al., 1990). Ainda, dependendo da concentração, o ATP extracelular tem se mostrado citotóxico ou mesmo inibidor do crescimento para muitas linhagens celulares de mamíferos, tais como, fibroblastos transformados de ratos (Weisman et al., 1988), células de linfomas, células leucêmicas (Spranzi et al., 1993), células tumorais pancreáticas, mamárias e epiteliais (Rapaport, 1983). Os mecanismos moleculares pelo qual o ATP exerce sua toxicidade ainda não estão totalmente definidos, mas acredita-se que sejam, principalmente, mediados por ativação de purinoreceptores P2X<sub>7</sub>. Especialmente devido às células transformadas serem muito mais suscetíveis aos efeitos do ATP, essa molécula já tem sido discutida como uma alternativa citostática que poderá encontrar uma aplicação na modulação do desenvolvimento de tumores e na terapia de doenças humanas (Schneider et al., 2001).



## **1.6. Adenosina**

A primeira evidência dos efeitos de um nucleosídeo extracelular foi observada no sistema cardiovascular pelo efeito hipotensivo da adenosina (Drury & Szent-Györgyi, 1929). A partir daí, outros estudos descreveram a importância deste nucleosídeo para a manutenção de uma série de processos fisiológicos em diversos tecidos.

A adenosina é um potente mensageiro extracelular produzido em altas concentrações, sob condições metabolicamente desfavoráveis. Este nucleosídeo desempenha um importante papel antiinflamatório endógeno (Cronstein, 1994), inibe a lise celular mediada por linfócitos e desenvolve atividade quimioativa em neutrófilos (Wolberg et al., 1975; Cronstein et al., 1983). Após a sua liberação, a adenosina induz seus efeitos biológicos através da interação com quatro subtipos de receptores de superfície celular. Estes, quando ativados representam uma potente via imunossupressora endógena que regula a resposta imune excessiva contra o insulto externo, exercendo um papel crucial na regulação das células do sistema imune (Thiel et al., 2003; Gessi et al., 2007).

Por estimular a proliferação celular, a adenosina tem sido considerada como uma molécula promotora de tumores (Mujjomdar et al., 2003; Morrone et al., 2003). Como resultado de uma alta proliferação celular e comprometimento vascular, os tumores sólidos apresentam áreas de hipóxia, aumento do consumo de glicose e liberação de lactato. Essas condições levam a um aumento dos níveis de adenosina, que estimula o crescimento tumoral e a angiogênese, bem como inibe a síntese de citocinas como a IL-2, uma molécula imunomodulatória essencial para proliferação e ativação das células T, levando à depleção dos linfócitos e prejuízo na função dos mesmos (Mujjomdar et al., 2003; Gessi et al., 2007). Entretanto, o mecanismo pelo qual esse nucleosídeo se acumula nos tumores e os resultados

específicos desse acúmulo são ainda contraditórios e necessitam de mais estudos para serem esclarecidos (Sphychala et al, 2004).

## **1.7. Nucleotidasas**

Os nucleotídeos extracelulares, após serem liberados e exercerem seus efeitos, pela interação com receptores específicos, podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas denominadas nucleotidasas, que podem estar presentes na superfície das membranas celulares (ecto-enzimas) ou ainda na forma solúvel no meio intracelular e/ou extracelular. Estas enzimas desempenham um papel fundamental no controle da homeostasia dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares (Zimmermann, 2001). As ectonucleotidasas encontram-se ancoradas na membrana plasmática possuindo seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, sendo que a atividade catalítica máxima é adaptada ao meio extracelular e requer cátions divalentes, tais como, cálcio ou magnésio, e um pH levemente alcalino. Além disso, na maioria dos casos, os valores de  $K_M$  estão na faixa micromolar (Zimmermann, 2000). Várias famílias destas enzimas podem degradar os nucleotídeos extracelulares, dependendo da especificidade por seus substratos. Entre elas, podemos citar os membros da família das NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), NPPs (nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases, PDEase) e as fosfatases alcalinas, que são responsáveis pela hidrólise dos nucleosídeos difosfatados e trifosfatados (ADP, ATP) até seus respectivos nucleosídeos monofosfatados (AMP). A 5'-nucleotidase também pertence a esse grupo de enzimas sendo responsável pela hidrólise dos nucleosídeos monofosfatados a seus respectivos nucleosídeos (adenosina) (Zimmermann, 2001).

### 1.7.1. NTPDases

A família das NTPDases designa um grupo de proteínas transmembrana que catalisa a hidrólise dos fosfatos  $\beta$  e  $\gamma$  de di e trifosfonucleosídeos extracelulares (Zimmermann, 2001), produzindo seus respectivos nucleosídeos monofosfatados. Membros dessa família estão presentes em todos os sistemas de mamíferos: sistema respiratório, sistema cardiovascular (Sevigny et al., 1997), sistema nervoso (Schadeck et al., 1989; Sarkis & Salto, 1991; Zimmermann & Braun, 1996), sistema imune (Maliszewski et al., 1994) e no sistema reprodutor (Lemmens et al., 2000).

Em mamíferos, oito membros dessa família (nomeados NTPDases1-8) já foram clonados e caracterizados, apresentando diversidade de preferência por substrato e distribuição tecidual (Zimmermann, 2001). A NTPDase1 (CD39) hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, enquanto a NTPDase2 (CD39L1) hidrolisa o ATP numa proporção 30 vezes maior do que o ADP. As NTPDases3 e 8 hidrolisam o ATP preferencialmente ao ADP, numa proporção de cerca de 3:1 e 2:1, respectivamente. As NTPDase4-7 estão associadas a membranas de organelas intracelulares. A NTPDase4 está ancorada ao aparelho de Golgi e prefere UDP como substrato. A NTPDase5 está ligada ao retículo endoplasmático e a NTPDase6 está ancorada ao aparelho de Golgi. Ambas têm preferência por nucleosídeos difosfatados, não possuem o domínio transmembrana C-terminal e podem ser clivadas próximo ao domínio N-terminal para formar uma proteína solúvel liberada. Já a NTPDase7 localiza-se em vesículas intracelulares e prefere nucleosídeos trifosfatados (Lavoie et al., 2004).

Evidências de que os nucleotídeos extracelulares afetam o crescimento e a migração celular (Agteresch et al., 1999) remetem à relação entre expressão de ectonucleotidases e

carcinogênese. A presença das NTPDases 2 e 5, bem como da 5'-nucleotidase foi recentemente caracterizada por Buffon e colaboradores (2007) em células tumorais de Walker 256. Além disso, um aumento na expressão da NTPDase 1 foi observado em melanomas diferenciados de humanos, sugerindo que esta proteína pode ser um marcador de diferenciação tumoral, por apresentar gradual diminuição com a progressão do tumor (Dzhandzhugazyan et al., 1998).

A NTPDase 1 também já foi identificada como um antígeno celular (CD39) linfóide e o aumento na sua expressão estaria relacionado com uma maior atividade ATPásica e ADPásica nestas células (Wang et al., 1997). A CD39 já havia sido descrita previamente como um marcador de ativação de linfócitos B e por estar expressa na superfície de células NK e linfócitos T citotóxicos (Kansas et al., 1991). Vuaden e colaboradores (2007) caracterizaram a presença das NTPDases 1-3 e 5'-nucleotidase em linfócitos obtidos de linfonodos mesentéricos de ratos.

Estudos anteriores realizados por nosso laboratório demonstraram, também, que o AAS exerce um efeito inibitório na atividade NTPDásica de plaquetas, sugerindo que este resultado poderia explicar um possível mecanismo pelo qual esta droga estaria modulando o processo tumoral (Buffon et al, 2004).

### **1.7.2. NPPs**

A família das nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (NPP, PDEase, EC 3.1.4.1) é constituída por sete membros numerados de acordo com sua ordem de clonagem (NPP1-7) (Stefan et al., 2005). Três dos sete membros dessa família, as NPPs 1-3, são conhecidas por hidrolisar nucleotídeos (Stefan et al., 2006).

Estas enzimas apresentam atividade de fosfodiesterase alcalina bem como atividade nucleotídeo pirofosfatase, hidrolisando uma grande variedade de substratos, como as purinas e pirimidinas. O p-nitrofenil-5'-timidina-monofosfato (p-nitrophenyl-TMP) é usado como substrato artificial, específico para as NPPs (Sakura et al., 1998).

A catálise mediada por NPPs afeta processos como proliferação e motilidade celular, angiogênese, mineralização óssea e digestão. Estão também envolvidas na patofisiologia do câncer, resistência à insulina e alterações na calcificação (Stefan et al., 2005).

A NPP2 tem sido descrita por estimular a proliferação, contração e migração celular (Stefan et al., 2005; Stefan et al., 2006) e foi identificada como um fator estimulante de motilidade tumoral secretado por melanomas (Goding et al., 2003).

### **1.7.3. 5'-nucleotidase**

A 5'-nucleotidase (CD73) é uma enzima ancorada à membrana por glicosil-fosfadidilinositol (GPI) e representa um marcador de maturação de linfócitos B e T. A enzima tem uma ampla distribuição tecidual e uma forma solúvel clivada tem sido descrita (Zimmermann, 2001). Sua principal função é a hidrólise de nucleotídeos monofosfatados a seus respectivos nucleosídeos, sendo que o AMP é o nucleotídeo hidrolisado com maior eficiência (Zimmermann, 1996).

A 5'-nucleotidase atua em conjunto com as NTPDases e NPPs hidrolisando o AMP, produzido por essas enzimas, até adenosina (Zimmermann, 1992). Esta, por sua vez, dependendo do receptor ativado, vai desencadear processos específicos. Também, tem sido descrito o envolvimento desta enzima na adesão celular (Zimmermann, 2001). Estudos com

linfócitos humanos identificaram a proteína 2 de adesão como sendo CD73, que medeia a adesão dos linfócitos ao endotélio (Fenoglio et al., 1997).

A atividade enzimática da 5'-nucleotidase em células tumorais também tem sido caracterizada. Sua presença foi descrita, recentemente, nas células tumorais de Walker 256 (forma ascítica do tumor) (Buffon et al., 2007) e uma atividade elevada desta enzima também foi encontrada em células de carcinoma de mama (Canbolat et al., 1996), câncer gástrico (Durak et al., 1994) e em glioblastomas (Fenoglio et al., 1997). Ainda, estudos demonstram que a alta expressão da 5'-nucleotidase em diferentes células de melanomas está associada com um fenótipo altamente invasivo (Sadej et al., 2006).

## **2. OBJETIVOS**

Considerando o envolvimento dos nucleotídeos da adenina no desenvolvimento de tumores e na resposta imune, o estudo das nucleotidases - por apresentarem um papel crucial na regulação dessas moléculas - poderá contribuir para o entendimento do processo tumoral. Assim, este estudo apresenta os seguintes objetivos:

2.1. Avaliar, em diferentes tempos, a hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina - ATP, ADP e AMP - em linfócitos de ratos adultos submetidos ao modelo tumoral de Walker 256;

2.2. Verificar uma possível modulação do AAS nas atividades nucleotidásicas em soro e linfócitos de ratos adultos submetidos a este modelo tumoral;

2.3. Avaliar a expressão das nucleotidases em linfonodos mesentéricos de ratos submetidos à inoculação tumoral e ao tratamento com AAS.

### **3. CAPÍTULOS**

#### **3.1. CAPÍTULO 1 - ARTIGO CIENTÍFICO**

## **Acetylsalicylic acid (ASA) alters adenine nucleotide hydrolysis from rat lymphocytes submitted to Walker 256 tumor**

Manuscrito submetido ao periódico *Life Sciences*



**Acetylsalicylic acid (ASA) alters adenine nucleotide hydrolysis from rat lymphocytes submitted to Walker 256 tumor**

Vanessa Bley Ribeiro<sup>a,\*</sup>, Vinícius Leivas Merlo<sup>a</sup>, Fernanada Cenci Vuaden<sup>a</sup>, Maurício Reis Bogo<sup>b</sup>, Carla Denise Bonan<sup>c</sup>, João José Freitas Sarkis<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Caixa Postal 1429, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

\* Corresponding Author

Vanessa Bley Ribeiro, Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: +55 51 3308 5555

FAX: +55 51 3308 5540

E-mail: vanebley@hotmail.com

## **Abstract**

Among other properties described for adenine nucleotides, an anti-cancer activity is suggested, since ATP has been shown to be cytotoxic for tumoral cells whereas adenosine has been shown to possess a tumor-promoting action. Moreover, many studies have also demonstrated the nucleotide involvement in immune response modulation. The actions induced by purinergic signaling are regulated by ectonucleotidases, which play an important regulatory role in the control of extracellular nucleotides and nucleosides levels. Numerous studies have suggested that the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs can protect against the development of cancer. In the present study, we evaluated the extracellular adenine nucleotide hydrolysis from rat lymphocytes submitted to the Walker 256 tumor model and a possible modulation of acetylsalicylic acid (ASA) on ectonucleotidase activities from rat lymphocytes submitted to the same model. Our results demonstrated a significant increase on ATP and ADP hydrolysis, ten days after the tumor induction and ASA treatment. The ASA administration also increased ATP and ADP hydrolysis from tumor-bearing rat lymphocytes. The transcriptional levels of NTPDases 1-3 were significantly increased in the tumor presence and differently affected by ASA administration. These results lead us to suggest that modulation on nucleotide levels in lymphocytes seems not contribute to beneficial effects of ASA in cancer.

**Keywords:** Walker 256 tumor, lymphocytes, ectonucleotidases, ATP, adenosine.

## **Introduction**

In addition to the various physiological and pathological properties already known for adenine nucleotides, an anticancer activity has been suggested (Rapaport, 1990; Abbracchio & Burnstock, 1998). Studies have indicated that ATP permeabilizes cell membranes and induces programmed cell death in several tumor cell systems in vitro (Beyer & Steinberg, 1991). This nucleotide has also been proposed to be involved in tumor cell killing, mediated by activated T-lymphocytes (Correale et al., 1997). Moreover, ATP promotes an inhibitory or cytotoxic effect in the growth of several mammalian cell lines, such as in mouse leukemia cells (Chahwala & Cantley, 1984) and in human cell lines, as leukemia cells (Spranzi et al., 1993), pancreatic carcinoma cells (Rapaport, 1983), breast cancer cells (Vandewalle et al., 1994), and skin carcinoma cells (Wiendl et al., 1998). Since extracellular ATP can display cytotoxic activity, it may be considered a potential compound for the modulation of tumoral cell development (Buffon et al., 2004).

Conversely, adenosine has been shown to possess a tumor-promoting action (Mujoomdar et al., 2003; Spychala, 2000). This nucleoside is an immediate catabolite of adenine nucleotides and a potent extracellular messenger produced in high concentrations under metabolically unfavorable conditions (Gessi et al., 2007). Adenosine released by solid tumors provides a supportive environment that benefits malignancy and may include protection against ischemia, stimulation of growth and angiogenesis, and suppression of immune responses (Spychala, 2000). It is known that human and mouse T lymphocytes express adenosine receptors and that their activation may lead to the depletion of lymphocytes and impairment of their functions (Mackenzie et al., 2002; Buckey, 2004; Hershfield, 2004).

The ectonucleotidases play an important regulatory role in the control of extracellular nucleotides and nucleosides levels, which present an important role in tumor growth (Burnstock, 2002; Spychala et al., 2004). The most important ecto-enzymes involved in extracellular adenine nucleotide hydrolysis are the NTPDases, which sequentially convert extracellular di and triphosphate nucleotides (such as ATP and ADP) to the monophosphate form (AMP), and the 5'-nucleotidase, which hydrolyzes monophosphate nucleotides to the respective nucleosides. (Zimmermann, 2001). Vuaden et al. (2006) have already shown that NTPDase1, 2, 3 and 5'-nucleotidase are expressed in mesenteric lymph nodes. The understanding of the mechanisms that control metastasis and invasion is critical for the identification of new targets for drug development.

Numerous studies have suggested that the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, including ASA (acetylsalicylic acid), can protect against the development of cancer (Williams et al., 1999). However, the mechanisms induced by these drugs in the reduction of cancer risk are not entirely understood. Studies from our laboratory have shown an inhibitory "in vitro" effect of ASA on NTPDase activity, suggesting a hypothesis for the actions of ASA on tumorigenesis (Buffon et al, 2004). In the present study, we have evaluated the extracellular adenine nucleotide hydrolysis from rat lymphocytes obtained after the subcutaneous Walker 256 tumor inoculation. Moreover, we have investigated the effect of ASA treatment in this model to verify a possible involvement of these enzymes in cancer growth and spread.

## **Materials and Methods**

### **Chemicals**

Nucleotides and Malachite Green Base were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Acetylsalicylic Acid (ASA) was obtained from Gerbras (Germany). All other reagents were of analytical grade.

### **Animals**

In all experiments, male Wistar rats of approximately 60 days-old, weighting around 250 g from our breeding stock were used, with water and food ad libitum. The animal house was kept on a 12 hours light/dark cycle in a constant room temperature. Procedures for the care and use of animals were adopted according to the regulations of Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council).

### **Walker 256 Tumor**

The Walker 256 carcinosarcoma (Guitani et al., 1982; 39: Rettori et al., 1995), (originally from the National Cancer Institute Bank, Cambridge, MA, USA), donated by Dr. T.C. Cavalcanti and Dr. O. Rettori, from the Laboratory of Biochemical Research, CAISM/UNICAMP, is currently being maintained in our laboratory via intraperitoneal or subcutaneous passages in rats. A Walker 256 tumor cell suspension ( $5 \times 10^6$  cells in 0.25 ml of Ringer-Lactate solution vehicle) was inoculated at a single dorsal subcutaneous site in the dorsolumbar region of the tumor-bearing group. Cell suspensions with 98% of viability estimated by trypan blue were obtained from the ascitic fluid of a donor rat. The control rat group received inoculation of the vehicle only.

### Isolation of lymphocytes

Mesenteric lymph nodes were removed from tumor-bearing and control rats at 6, 10 or 15 days after tumor cell or vehicle inoculation, respectively, and passed through a mesh grid in 0.9% saline (Wu et al., 1991). The methodology used for isolation of lymphocytes from mesenteric lymph nodes followed the protocol previously described by our group (Vuaden et al., 2007).

### Administration of ASA

The ASA effect on adenine nucleotide hydrolysis from rat lymphocytes was only investigated 10 days after the tumor inoculation. The tumor + ASA group received a daily oral dose (gavage) of 30 mg/kg ASA during nine days after the tumor inoculation (day 1) (Barnes et al., 1995). Three control groups were performed: (1) sham group that received the subcutaneous injection of vehicle in the dorsolumbar region, (2) tumor group, that received the tumor inoculation in the dorsolumbar region, and (3) ASA group, that received a daily oral dose of 30 mg/kg ASA. One day after the last treatment, lymphocytes were isolated and experiments were performed (day 10).

### Enzyme assay

#### Measurement of lymphocyte ATP, ADP and AMP hydrolysis

The nucleotide hydrolysis was determined using a modification of the method described by Fillipinni et al. (1990). The reaction medium containing 2 mM  $\text{CaCl}_2$  (for ATP and ADP) or  $\text{MgCl}_2$  (for AMP), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 60 mM glucose, 1 mM sodium azide, 0.1% mM albumin and 20 mM Hepes buffer, pH 7.6, in a final volume of 200  $\mu\text{l}$ . About  $10^6$  cells of lymphocytes were added to the reaction medium and the enzyme

reaction started by the addition of ATP, ADP or AMP at a final concentration of 2 mM and incubated for 30 minutes at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of 200 µl of 10% TCA. The samples were chilled on ice and the amount of Pi released was measured by Chan et al. (1986). In order to correct non-enzymatic hydrolysis, we performed controls by adding the cells after the reaction was stopped with TCA. All samples were assayed in triplicate.

#### Analysis of gene expression by semi-quantitative RT-PCR

The expression analysis of NTPDases1-3 was carried out by a semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Ten days after the tumor inoculation, mesenteric lymph nodes of rats were isolated for total RNA extraction with TRIzol® Reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions. RNA purity was quantified spectrophotometrically and tested by electrophoresis in a 1.0% agarose gel containing gel Red. The cDNA species were synthesized with SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) from 3 µg of total RNA following suppliers. RT reactions were performed for 50 min at 42 °C. cDNA (1 µL) was used as a template for PCR with specific primers for NTPDase1, 2, and 3. β-actin-PCR was performed as a control for cDNA synthesis. PCR reactions have a volume of 25 µL using a concentration of 0.4 µM of each primer indicated below and 200 µM MgCl<sub>2</sub> and 1 U Taq polymerase (Invitrogen) in the supplied reaction buffer. Conditions for all PCR were as follows: initial 1 min denaturation step at 94 °C, 1 min at 94°C, 1 min annealing step (NTPDase1, and 3: 65 °C; NTPDase2: 66 °C; β-actin: 58.5 °C), 1 min extension step at 72°C for 35 cycles and a 10 min final extension at 72 °C. The amplification products were: NTPDase1 — 543 bp;

NTPDase2 — 331 bp; NTPDase3—267 bp;  $\beta$ -actin — 210 bp. For each set of PCR reactions, negative control was included. PCR products were submitted to electrophoresis using a 1% agarose gel containing gel Red. The Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) was used as molecular marker. The relative abundance of each mRNA versus  $\beta$ -actin was determined by densitometry using the freeware ImageJ 1.37 for Windows. The following set of primers were used: for NTPDase 1: 5'-GAT CAT CAC TGG GCA GGA GGA AGG-3' and 5'- AAG ACA CCG TTG AAG GCA CAC TGG-3'; for NTPDase 2: 5'-GCT GGG TGG GCC GGT GGATAC G-3' and 5'-ATTGAA GGCCCG GGGACG CTG AC-3; for NTPDase 3: 5'-CGG GAT CCT TGC TGT GCG TGG CAT TTC TT-3' and 5'- TCT AGA GGT GCT CTG GCA GGA ATC AGT-3'; for  $\beta$ -actin: 5'-TAT GCCAAC ACA GTG CTG TCT GG-3' and 5'-TAC TCC TGC TTC CTG ATC CAC AT-3'.

#### Statistical analysis

The data obtained were represented as mean  $\pm$  S.D. Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey multiple range test, considering  $P < 0.05$ , as significant.

### **Results**

#### Adenine nucleotides hydrolysis from rat lymphocytes after tumor inoculation

The effect of Walker 256 tumor on ATP, ADP and AMP hydrolysis was evaluated in rat lymphocytes at 6, 10, and 15 days after tumor induction. As shown in Fig. 1A and 1B, our results demonstrated a significant increase on ATP (33 %) and ADP (46 %) hydrolysis, respectively, at 10 days after the tumor induction when compared to respective



control group. The hydrolysis of these substrates was not changed in groups tested at 6 and 15 days. AMP hydrolysis was not altered in the three time periods tested (Fig. 1C).

Evaluation of ASA treatment on adenine nucleotides hydrolysis from rat lymphocytes after tumor inoculation

After to investigate the effect of tumor inoculation, as described above, we evaluated the ASA effect on adenine nucleotide hydrolysis in rat lymphocytes 10 days after the tumor inoculation, since this time period showed significant alterations in the enzyme activity. As shown in Fig. 2A and 2B, a significant increase on ATP (77 %) and ADP (84%) hydrolysis, respectively, was observed for the ASA group. In the same figures, we observed an increase around 20% on ATP and ADP hydrolysis in tumor + ASA group, when compared to tumor group. However, there is no significant difference between tumor + ASA and ASA groups (Fig. 2A and 2B). AMP hydrolysis was not altered in all groups tested (data not shown). The ASA vehicle (0.25% wt/vol carboxymethylcellulose in 0.15N HCl) administration did not affect the substrate hydrolysis when compared to the control (data not shown).

Ectonucleotidase mRNAs expression after tumor inoculation and ASA treatment from rat lymphocytes

Since we have found changes in nucleotide hydrolysis after the tumor induction and ASA treatment, we investigated mRNA transcript levels of NTPDases1-3 in mesenteric lymph nodes 10 days after tumor inoculation. As shown in Fig. 3, we observed that all enzymes analyzed were detected. The tumor inoculation increased NTPDase1, 2, and 3 transcriptions when compared to control groups (Fig. 3). The results have shown that

NTPDase1 transcription was decreased in ASA and tumor + ASA groups (Fig. 3A and 3B) whereas NTPDase2 did not modify its expression in both groups (Fig. 3C and 3D). For NTPDase3, we observed that ASA and tumor + ASA groups induced an increase on enzyme transcription (Fig. 3E and 3F).

## **Discussion**

The present study has been performed to investigate the extracellular adenine nucleotide hydrolysis from lymphocytes of tumor-bearing rat and the effect of ASA treatment in this tumoral model. Extracellular nucleotides are known to exhibit several physiological effects, such as control of platelet aggregation, cardiovascular effects and neurotransmission (Burnstock, 2006). Moreover, ATP has been shown to be growth inhibitory or even cytotoxic for several mammalian cell lines (Chahwala & Cantley, 1984; Weisman et al., 1988; Di Virgilio et al., 1989; Spranzi et al., 1993). ATP and P2 receptors are key players in the activation phases of the immune response, demonstrating that purinergic system might be a relevant pathway in host defense (Di Virgilio, 2007). In addition, changes in ectonucleotidase activities have been reported in several tumoral cells, such as in human melanoma (Dzhandzhugazyan et al., 1998) and glioma cell lines (Wink et al., 2003). Here we described an increase on NTPDase activity from rat lymphocytes 10 days after the tumor induction whereas the AMP hydrolysis did not change in the same groups tested. Reports have already proposed the involvement of extracellular ATP in tumor cell-killing mediated by T-lymphocytes. Mouse cytotoxic T-lymphocytes activated via CD3, as well as IL-2 activated mouse splenocytes, secrete large amounts of ATP (Gordon, 1986; Di Virgilio et al., 1989; Di Virgilio et al., 1990; Filippini et al., 1990; Redegeld et al., 1991) that can induce tumor cell death through specific cell-membrane

purinoceptor activation (Correale et al., 1997). Moreover, it is described that ATP could be secreted by cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) in response to activating stimuli (Filippini et al., 1990; Redegeld et al., 1991). Our results are in agreement with these findings, since Fillipini et al. (1990) have already proposed that an increased ATP hydrolysis could be a protective mechanism of the lymphocytes from cell death induced by high concentrations of this nucleotide.

It is important to note that the Walker 256 tumor grows without causing apparent physiological disturbances for a certain period of time (usually about 5–8 days) in rats inoculated with these tumoral cells. This period is suddenly interrupted by the initiation of a period of rapid tumor growth and marked metabolic changes in the host (Rettori et al., 1995). Buffon et al. (2007) have recently shown that NTPDase and 5'-nucleotidase genes were more expressed in Walker tumor cells, mainly at 10 days after the tumor induction when compared with 6 and 15 days.

The 5'-nucleotidase activity (Decking, 1997; Ledoux, 2003) is responsible for a significant adenosine accumulation in sites of tissue injury (Lukashev et al., 2004) and represents the major enzyme responsible for the extracellular production of adenosine from AMP. Besides to provide a supportive environment that benefits malignancy, adenosine also can promote suppression of immune responses. The levels of adenosine in solid tumors are sufficient to interfere with the anti-tumor immune response by suppressing T cell activation (Hoskin et al., 1994) and the interaction of T lymphocytes with tumor cells (Mackenzie et al., 2002; Gessi et al., 2007). Thus, given the strong immunosuppressive function of this nucleoside, it may constitute an important part of the “immunological barrier” that is responsible for the failure of the immune system response towards malignant cells (Spychala, 2000). Because T cells play a major role in anti-tumor immunity

(Gessi et al., 2007) and considering the adenosine malignancy, a decrease on ATP levels could represent an interesting mechanism by which lymphocytes protect themselves of the ATP cytotoxicity. In contrast, an increase of adenosine levels could impair the immune response promoted by these cells. Therefore, the modulation of nucleotide and nucleoside levels may play an important influence in the tumor progression.

Numerous studies have suggested that the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs can protect against the development of cancer (Williams et al., 1999). In human, ASA has been associated with a decreased risk for colorectal cancer (Bucher et al., 1999; Williams et al., 1999; Fosslie, 2000) and gastric and esophageal neoplasms (Gridley et al., 1993; Giovannucci et al., 1995), but certain mechanisms by which ASA acts are not entirely clear. Our findings demonstrate that ASA per se leads to an increase on ATP and ADP hydrolysis in lymphocytes. Considering that ASA presents anti-inflammatory properties (Costello & Green, 1987; Goodman & Gilman, 2006), and ATP is a pro-inflammatory molecule (Ralevic & Burnstock, 1998), a decrease of ATP levels could be important for the pharmacological actions of ASA. In accordance, Cheung et al. (1994) demonstrated that aspirin enhanced ecto-ATP diphosphohydrolase activity in human endothelial cells “in vitro”. Here, we also observe an interaction between tumor induction and ASA treatment, modulating NTPDase activity in lymphocytes. Our results suggest that the modulation of NTPDase activity after ASA treatment in the presence of tumor could reduce the ATP levels and, consequently, by a stoichiometric effect, could increase adenosine levels. Since ATP has pro-inflammatory and cytotoxic properties against transformed and non-transformed cells and adenosine present immunosuppressive responses, the modulation of nucleotide levels mediated by lymphocytes did not contribute for the beneficial effects induced by ASA treatment in cancer.

The kinetic effect promoted by both tumor induction and/or ASA treatment could be a consequence of transcriptional control and/or post-translational mechanisms. Therefore, we have studied the relative expression of NTPDases1, NTPDase2, NTPDase3 in rat mesenteric lymph nodes. Concerning the effect induced by tumor induction, we showed that NTPDases1, 2 and 3 mRNA transcript levels are increased, suggesting that all enzymes can be contributing to enhancement of ATP and ADP hydrolysis observed in this group. On the other hand, the enzyme transcriptions were differently affected by ASA: the NTPDase2 transcription was not altered whereas NTPDase3 expression was increased and NTPDase1 expression was decreased. The increase on ATP and ADP hydrolysis could be a result of the action of enzymes NTPDase1 and 3. Despite the enzyme activities increased in ASA and tumor +ASA groups, NTPDase1 mRNA levels has been decreased. The mechanism that could explain the up-regulation of enzyme activities and at the same time down-regulation of transcriptional levels is known as negative feedback autoregulatory loop. This mechanism allows for genes that are not transcription factors to negatively regulate their own synthesis (Krishna et al., 2006). We also observed that ectonucleotidase expressions in tumor + ASA group followed the same pattern of ASA independently, thus, suggesting its predominant effect is in the interaction.

The other plausible explanation for the changes in the enzyme activities after tumor inoculation and/or ASA treatment may involve post-translational events. According to analysis performed in NetPhosk, a kinase-specific prediction of protein phosphorylation sites tool (<http://www.cbs.dtu.dk/>) (Blom et al., 2004), NTPDases1 sequence present a potential PKC phosphorylation site on Thr301 residue. Our hypothesis is supported by other studies that have already been demonstrated the involvement of ASA and PCK activation (Wang, 2006; Redlak et al., 2007). Thus, this result suggests that

phosphorylation may exert a modulation on this enzyme activity in mesenteric lymph nodes of rats. Based on the different expression profiles of NTPDases1-3 observed, it is possible to suggest that transcriptional control may act in synergy with post-translational events, such as phosphorylation, in order to up-regulate ectonucleotidase activities.

In summary, the findings reported here have shown that tumor induction and/or ASA treatment were able to modulate NTPDases transcriptional levels, as well, enzymatic activity. The ASA effects mediated by lymphocytes seem to be not involved in cancer progression, but our results may contribute to a better understanding about the cancer mechanisms.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from CNPq-Brasil and CAPES.

## References

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., 1998. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Japanese Journal of Pharmacology* 78 (2),113–45.
- Barnes, C.J., Lee, M., Hardman, W.E., Cameron, I.L., 1995. Aspirin, age, and proximity to lymphoid nodules influence cell proliferation parameters in rat colonic crypts. *Cell proliferation* 28 (2), 59-71.
- Beyer, E.C., Steinberg, T.H., 1991. Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP-induced pore of mouse macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 266 (13), 7971-7974.
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., Brunak, S., 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4 (6), 1633-49.
- Bruton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L., 2006. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*, eleventh ed. Mc Graw Hill, Rio de Janeiro.
- Bucher, C., Jordan, P., Nickleit, V., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., 1999. Relative risk of malignant tumors in analgesic abusers. Effects of long-term intake of aspirin. *Clinical Nephrology* 51 (2), 67-72.
- Buckley, R.H., 2004. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annual Review of Immunology* 22, 625-655.
- Buffon, A., Ribeiro, V.B., Furstenu, C.R., Battastini, A.M.O., Sarkis, J.J.F., 2004. Acetylsalicylic acid inhibits ATP diphosphohydrolase activity by platelets from adult rats. *Clinica Chimica Acta* 349 (1-2), 53–60.
- Buffon, A., Wink, M.R., Ribeiro, V.B., Casali, E.A., Libermann, T.A., Zerbini, L.F., Robson, S.C., Sarkis, J.J.F., 2007. NTPDase and 5' nucleotidase expression profiles and the

pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770 (8), 1259-1265.

Burnstock, G., 2006. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacological Reviews* 58 (1), 58-86.

Burnstock, G., 2002. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signaling. *Clinical Medicine* 2 (1), 45-53.

Chahwala, S.B., Cantley, L.C., 1984. Extracellular ATP induces ion fluxes and inhibits growth of friend erythroleukemia cells. *Journal of Biological Chemistry* 259 (22), 13717-13722.

Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157 (2), 375-380.

Cheung, P.K., Visser, J., Bakker, W.W., 1994. Upregulation of antithrombotic ectonucleotidases by aspirin in human endothelial cells in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46 (12), 1032-1034.

Correale, P., Tagliaferri, P., Guarrasi, R., Caraglia, M., Giuliano, M., Marinetti, M.R., Bianco, A.R., Procopio, A., 1997. Extracellular adenosine 5' triphosphate involvement in the death of LAK-engaged human tumor cells via P2X-receptor activation. *Immunology Letters* 55 (2), 69-78.

Costello, P.B., Green, F.A., 1987. The extracellular control of intracellular aspirin hydrolysis. *Arthritis Rheumatism* 30 (4), 412-418.

Decking, U.K., Schlieper, G., Kroll, K., Schrader, J., 1997. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circulation Research* 81 (2), 154-164.



Di Virgilio, F., Bronte, V., Collavo, D., Zanovello, P., 1989. Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5' triphosphate( ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. *Journal of Immunology* 143 (6), 1955-1960.

Di Virgilio, F., Pizzo, P., Zanovello, P., Bronte, V., Collavo, D., 1990. Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Today* 11 (8), 274-277.

Di Virgilio, F., 2007. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signalling* 3,1-3.

Dzhandzhugazyan, K.N., Kirkin, A.F., Straten, P., Zeuthen, J., 1998. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated humanmelanomas. *FEBS Letters* 430 (3), 227-230.

Filippini, A., Taffs, R.E., Agui, T., Sitkovsky, M.V., 1990. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes, protection of the cytolytic effects of extracellular ATP. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1), 334–340.

Fosslien, E., 2000. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 30 (1), 3-21.

Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Fogli, E., Sacchetto, V., Benini, A., Leung, E., MacLennan, S., Borea, P.A., 2007. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signalling* 3, 109-116.

Giovannucci, E., Egan, K.M., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willet, W.C., Speizer, F.E., 1995. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *New England Journal of Medicine* 333 (10), 609-614.

Gordon, J.L., 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochemical Journal* 233 (2), 309-319.

Gridley, G., McLaughlin, J.K., Ekblom, A., Klareskog, L., Adami, H.O., Hacker, D.G., Hoover, R., Fraumeni, J.F. Jr., 1993. Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis. *Journal of the National Cancer Institute* 85 (4), 307-311.

Guaitani, A., Recchia, M., Carli, M., Rocchetti, M., Bartosek, I., Garattini, S., 1982. Walker carcinoma 256: A model for studies on tumor induced anorexia and cachexia. *Oncology* 39 (3), 173-178.

Hershfield, M.S., 2004. Combined immune deficiencies due to purine enzyme defects, In: Sthiem ER, Ochs HD, Winkelstein JA (eds) *Immunologic disorders in infants and children*, fifth ed. Saunders, Philadelphia, pp 480-504.

Hoskin, D.W., Reynolds, T., Blay, J., 1994. Adenosine as a possible inhibitor of killer T-cell activation in the microenvironment of solid tumors. *International Journal of Cancer* 59 (6), 854-855.

Krishna, S., Andersson, A.M., Semsey, S., Sneppen, K., 2006. Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. *Nucleic Acids Research* 34 (8), 2455–2462.

Ledoux, S., 2003. Hypoxia enhances ecto-5'-nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells. *Circulation Research* 92 (8), 848-855.

Lukashev, D., Ohta, A., Apasov, S., Chen, J.F., Sitkovsky, M., 2004. Cutting edge: physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein-coupled A<sub>2A</sub> adenosine receptor in vivo. *Journal of Immunology* 173 (1), 21-24.

Mackenzie, W.M., Hoskin, D.W., Blay, J., 2002. Adenosine suppresses alpha(4)beta(7) integrin-mediated adhesion of T lymphocytes to colon adenocarcinoma cells. *Experimental Cell Research* 276 (1), 90-100.

Mujoomdar, M., Hoskin, D., Blay, J., 2003. Adenosine stimulation of the proliferation of colorectal carcinoma cell lines. Roles of cell density and adenosine metabolism. *Biochemical Pharmacology* 66 (9), 1737–1747.

Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pirimidines. *Pharmacological Reviews* 50 (3), 413-492.

Rapaport, E., 1990. Mechanisms of anticancer activities of adenine nucleotides in tumorbearing-hosts. *Annals of the New York Academy of Sciences* 603, 142-149.

Rapaport, E., 1983. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *Journal of Cellular Physiology* 144 (3), 279-283.

Redegeld, F., Filippini, A., Sitkovsky, M.V., 1991. Comparative studies of the cytotoxic T lymphocyte-mediated cytotoxicity and extracellular ATP-induced cell lysis. *Journal of Immunology* 147 (10), 3638-3645.

Redlak, M.J., Power, J.J., Miller, T.A., 2007. Aspirin-induced apoptosis in human gastric cancer epithelial cells: relationship with protein kinase C signaling. *Digestive Diseases Sciences* 52 (3), 810-816.

Rettori, O., Vieira-Matos, A.N., Tahin, Q.S., 1995. Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by the Walker 256 tumor progression in rats. *Tumori* 81 (5), 370-377.

Spranzi, E., Djeu, J.Y., Hoffman, S.L., Epling-Burnette, P.K., Blanchard, D.K., 1993. Lysis of human monocytic leukemia cells by extracellular adenosine triphosphate: mechanism and characterization of adenosine triphosphate receptor. *Blood* 82 (5), 1578–85.

Spychala, J., Lazarowski, E., Ostapkowicz, A., Ayscue, L.H., Jin, A., 2004. Mitchell BS. Role of estrogen in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 10 (2), 708-717.

Spychala, J., 2000. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacologic & Therapy* 87 (2-3), 161-173.

Vandewalle, B., Hornez, L., Revillion, F., Lefebvre, J., 1994. Effect of extracellular ATP on breast tumor cells growth, implication of intracellular calcium. *Cancer Letters* 85 (1), 47-54.

Vuaden, F.C., Cognato, G.P., Bonorino, C., Bogo, M.R., Sarkis, J.J.F., Bonan, C.D., 2007. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats. *Life Sciences* 80 (19), 1784-1791.

Wang, S., 2006. Facilitatory effect of aspirin on glutamate release from rat hippocampal nerve terminals: involvement of protein kinase C pathway. *Neurochemistry International* 48 (3), 181-190.

Weisman, G.A., Lustig, K.D., Lane, E., Huang, N., Belzer, I., Friedberg, I., 1988. Growth inhibition of transformed mouse fibroblasts by adenine nucleotides occurs via generation of extracellular adenosine. *Journal of Biological Chemistry* 263 (25), 12367-12372.

Wiendl, H.S., Schneider, C., Ogilvie, A., 1998. Nucleotide metabolizing ectoenzymes are upregulated in A431 cells periodically treated with cytostatic ATP leading to partial resistance without preventing apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1404 (3), 282-298.

Williams, C., Shattuck-Brandt, R.L., Dubois, R.N., 1999. The role of COX-2 in intestinal cancer. *Expert opinion on investigational drugs* 8 (1), 1-12.

Williams, C.S., Mann, M., DuBois, R.N., 1999. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene* 18 (55), 7908-7916.

Wink, M.R., Lenz, G., Braganhol, E., Tamajusuku, A.S., Schwartzmann, G., Sarkis, J.J.F., Battastini, A.M.O., 2003. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer Letters* 198 (2), 211-218.

Wu, G., Field, C.J., Marliss, E.B., 1991. Glutamine and glucose metabolism in rat splenocytes and mesenteric lymph node lymphocytes. *American Journal of Physiology* 260 (1 Pt 1), 141-147.

Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research* 52, 44-56.

## Legends to figures

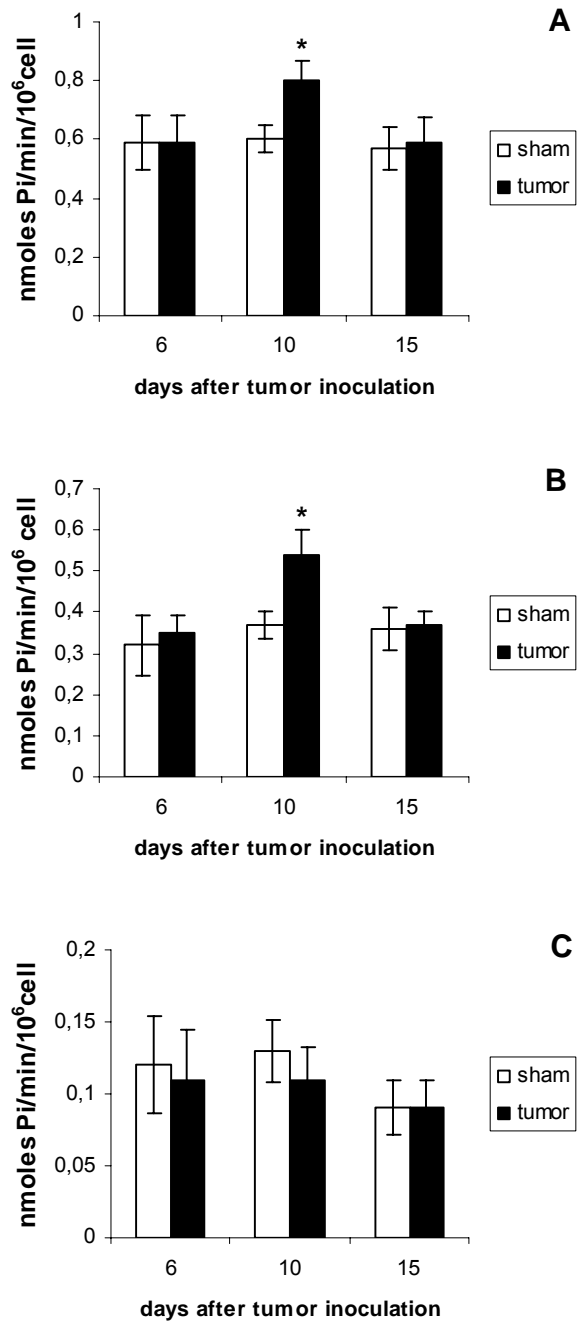
**Figure 1.** ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis from rat lymphocytes 6, 10 and 15 days after tumor inoculation. Bars represent mean  $\pm$  S.D. for at least five independent experiments. Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey multiple range test,  $p < 0.001$ , as significant (\*).

**Figure 2.** Effect of ASA treatment on ATP (A) and ADP (B) hydrolysis from rat lymphocytes submitted to tumoral model. Bars represent mean  $\pm$  S.D. for at least five independent experiments. \* Significantly different from control group. # Significantly different from tumor group. Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey multiple range test,  $p < 0.03$ , as significant.

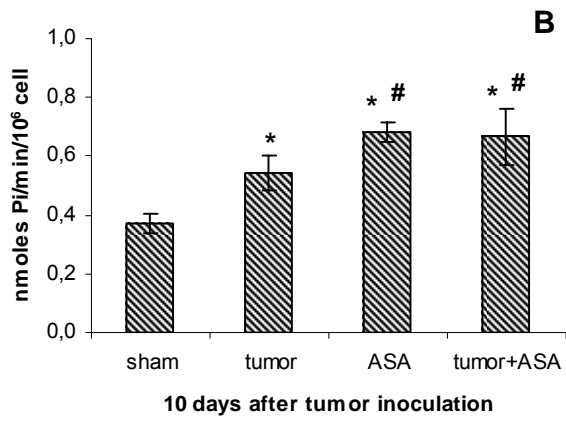
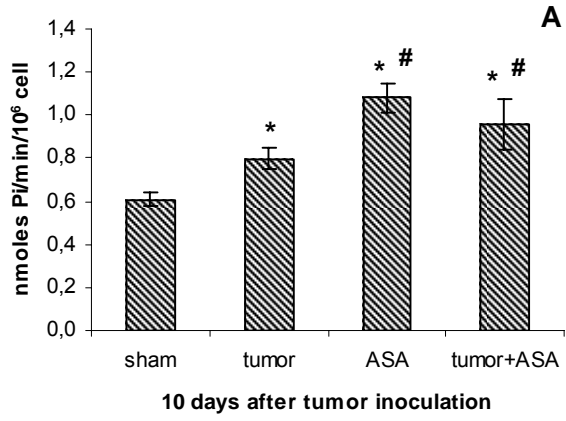
**Figure 3.** Gene expression patterns after ASA treatment for NTPDases 1, 2, 3 and  $\beta$ -actin in mesenteric lymph nodes of rats submitted to tumoral model. RNA was isolated being subjected to RT-PCR for the indicated targets. Bars represent mean  $\pm$  S.D. for at least three independent experiments. \* Significantly different from control group. # Significantly different from tumor group. Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey multiple range test,  $p < 0.05$ , as significant.

## Figures

Figure 1

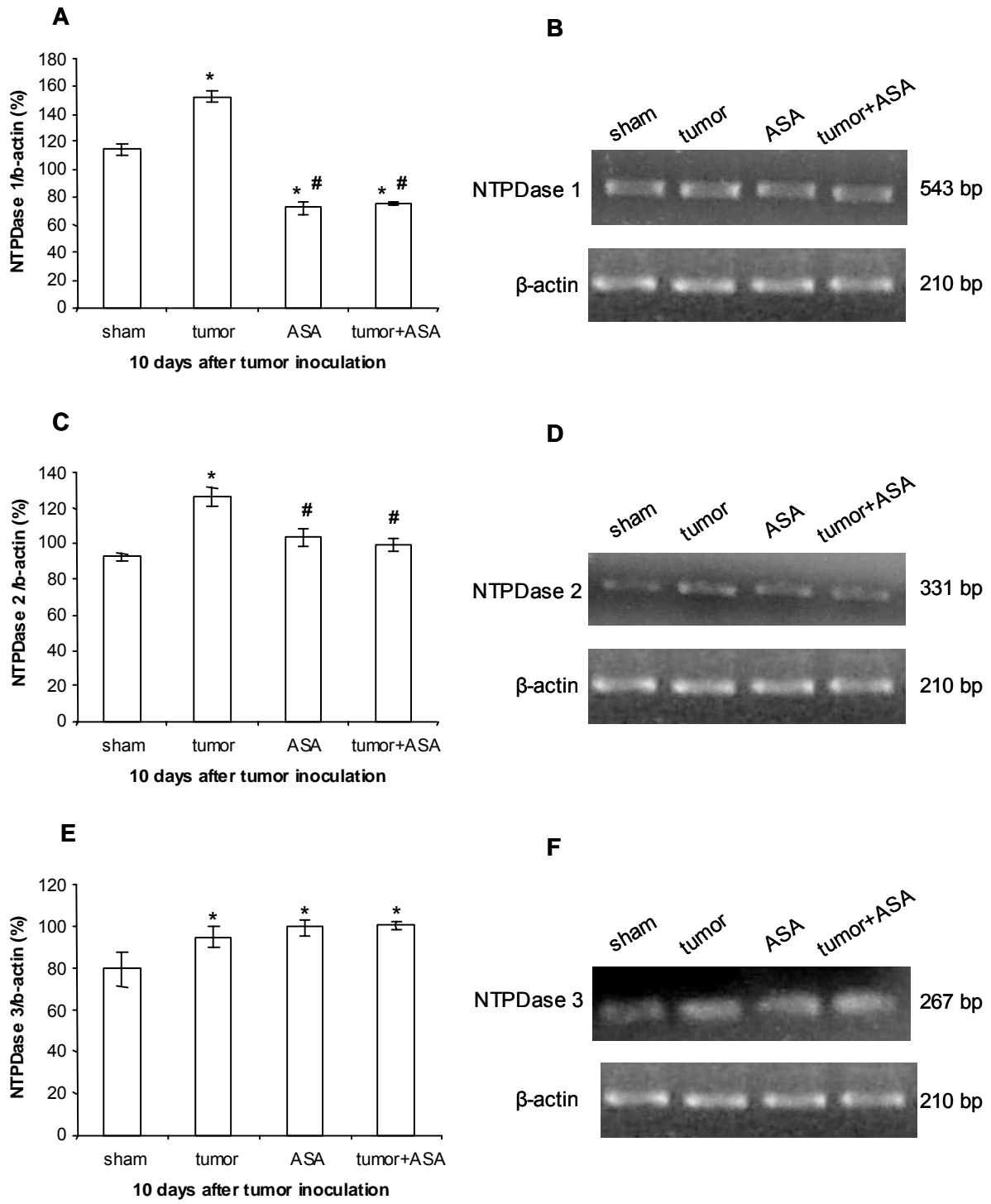


**Figure 2**





**Figure 3**



### **3.2. CAPÍTULO 2 – RESULTADOS PRELIMINARES**

#### **Acetylsalicylic acid modulates nucleotidase activities from blood serum of rats submitted to Walker 256 tumor model**

Vanessa Bley Ribeiro<sup>\*</sup>, Denise Barbosa Ramos, Vinícius Leivas Merlo, Carla Denise

Bonan, João José Freitas Sarkis

Os resultados apresentados neste capítulo foram obtidos durante o mestrado e serão concluídos com a realização de mais experimentos para a elaboração do artigo final, ao qual serão acrescentados o resumo, a introdução, os resultados finais, a discussão e as referências bibliográficas.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório avaliaram o efeito da inoculação do tumor de Walker 256 sobre a hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina em soro de ratos (Buffon et al., 2006). Foi observada uma diminuição significativa na hidrólise de ATP, ADP e AMP 6, 10 e 15 dias após a indução do tumor. Neste capítulo, nosso objetivo foi avaliar o efeito do tratamento com o ácido acetilsalicílico sobre as atividades nucleotidásicas em soro de ratos. Desta forma, a influência do AAS sobre a hidrólise de nucleotídeos foi observada durante os mesmos períodos de tempo após a indução deste mesmo modelo tumoral.

## Materials and Methods

### Walker 256 Tumor

The Walker 256 carcinosarcoma (Guaitani et al., 1982; 39: Rettori et al., 1995), (originally from the National Cancer Institute Bank, Cambridge, MA, USA), donated by Dr. T.C. Cavalcanti and Dr. O. Rettori, from the Laboratory of Biochemical Research, CAISM/UNICAMP, is currently being maintained in our laboratory via intraperitoneal or subcutaneous passages in rats. A Walker 256 tumor cell suspension ( $5 \times 10^6$  cells in 0.25 ml of Ringer-Lactate solution vehicle) was inoculated at a single dorsal subcutaneous site

in the dorsolumbar region of the tumor-bearing group. Cell suspensions with 98% of viability estimated by trypan blue were obtained from the ascitic fluid of a donor rat. The control rat group received inoculation of the vehicle only.

#### *Administration of ASA*

Tumor + ASA group, after the tumor inoculation (day 1), received a daily oral dose (gavage) of 30 mg/kg (Barnes et al., 1995) of ASA for 6, 10 or 15 days. Three control groups were performed: (1) sham group, that received the subcutaneous injection of vehicle in the dorsolumbar region, (2) tumor group, that received the tumor inoculation in the dorsolumbar region and (3) ASA group, that received a daily oral dose of 30 mg/kg of ASA. The serum was obtained in days mentioned above and the experiments were performed immediately.

#### *Isolation of blood serum fraction*

Blood samples were drawn after decapitation of tumor-bearing rats and control groups 6, 10 and 15 days after tumor cell or vehicle inoculation and were soon centrifuged in plastic tubes at 5000 g for 5 minutes at 20 °C. The serum samples obtained were then stored on ice and immediately used in experiments (Oses *et al.*, 2004).

#### *Measurement of blood serum ATP, ADP and AMP hydrolysis*

ATP, ADP and AMP hydrolysis were determined using a modification of the method described by Yegutkin (1997) according to Oses et al. (2004). The reaction mixture containing 3 mM of substrate, 112.5 mM Tris-HCl, pH 8.0, was incubated with approximately 1.0 mg of serum protein at 37 °C for 40 minutes in a final volume of 200 µl.

The reaction was stopped by the addition of 200  $\mu$ l of 10% trichloroacetic acid (TCA). The samples were chilled on ice and the amount of inorganic phosphate (Pi) released was measured as described by Chan et al. (1986). In order to correct non-enzymatic hydrolysis, we performed controls by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. All samples were centrifuged at 5000  $g$  for 5 minutes to eliminate precipitated protein and the supernatant was used for the colorimetric assay. All samples were assayed in triplicate.

### *Statistical analysis*

The data obtained are represented as mean  $\pm$  S.D. Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey multiple range test, considering  $P < 0.05$  as significant.

## **Results**

### *Evaluation of ASA treatment on adenine nucleotide hydrolysis from rat blood serum after tumor inoculation*

*ATP hydrolysis* (Fig. 1). Our results demonstrate a significant decrease (about 20%) on ATP hydrolysis at 10 (Fig. 1B) and 15 (Fig 1C) days after tumor inoculation (tumor group). There was a trend of ASA (ASA group) to increase the ATP hydrolysis, but a significant result was only observed at 10 days (28%) of treatment. The tumor + ASA group was significantly different of tumor group only at 6 day period (Fig. 1A). However, the tumor + ASA group was significantly different when compared to ASA group for all time periods investigated (Fig.1A, 1B, and 1C).

*ADP hydrolysis* (Fig. 2). In the tumor group we detected a decrease on ADP hydrolysis at 6 (32%), 10 (19%) and 15 (40%) days (Fig. 2A, 2B and 2C, respectively). A significant increase on ADP hydrolysis was obtained in ASA group at 6 (30%) and 10 (34%) days after the treatment (Fig. 2A and 2B), but just a trend of increase was observed at 15 days of treatment. There was no significant changes on ADP hydrolysis when compared tumor + ASA and tumor groups. ADP hydrolysis for the tumor + ASA group was significantly different when compared to ASA group for all time periods investigated (Fig.2A, 2B, and 2C).

*AMP hydrolysis* (Fig. 3). A significant decrease (43%) on AMP hydrolysis was only observed at 15 days after tumor inoculation (Fig. 3C). The ASA group, followed the same pattern observed for ADP hydrolysis, presenting an increase on AMP hydrolysis at 6 (38%) and 10 (56%) days after the treatment (Fig. 3A and 3B). The tumor + ASA group was significantly different of tumor group only at 6 day period (Fig. 3A). AMP hydrolysis for the tumor +ASA group was significantly different when compared to ASA group for all time periods investigated (Fig.3A, 3B, and 3C).

### Legend to figures

**Figure 1.** Effect of ASA treatment on ATP hydrolysis from rat *blood* serum 6 (A), 10 (B) and 15 (C) days after tumor inoculation. Bars represent mean  $\pm$  S.D. for at least five independent experiments. \* Significantly different from control group. # Significantly different from tumor group. \* Significantly different from ASA group. Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey multiple range test,  $P < 0.05$ , as significant.

**Figure 2.** Effect of ASA treatment on ADP hydrolysis from rat *blood* serum 6 (A), 10 (B) and 15 (C) days after tumor inoculation. Bars represent mean  $\pm$  S.D. for at least five independent experiments. \* Significantly different from control group. # Significantly different from tumor group. \* Significantly different from ASA group. Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey multiple range test,  $P < 0.05$ , as significant.

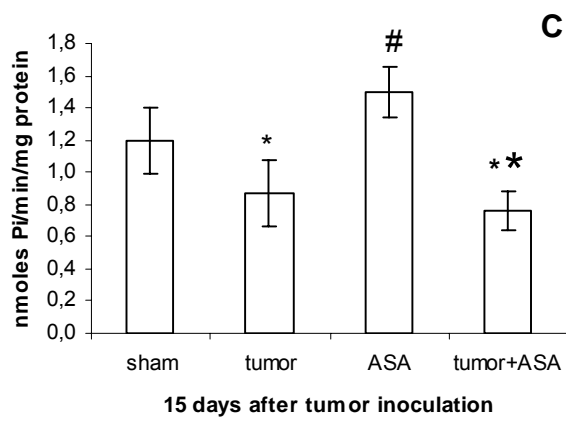
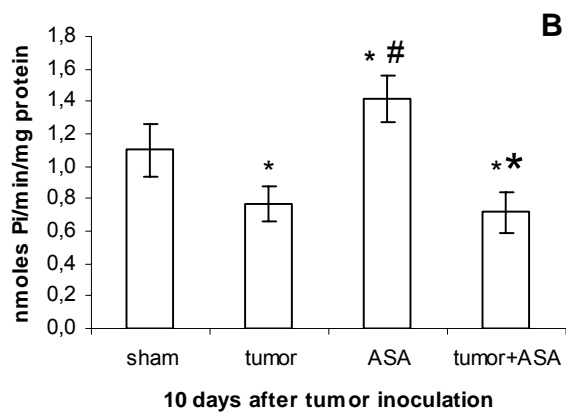
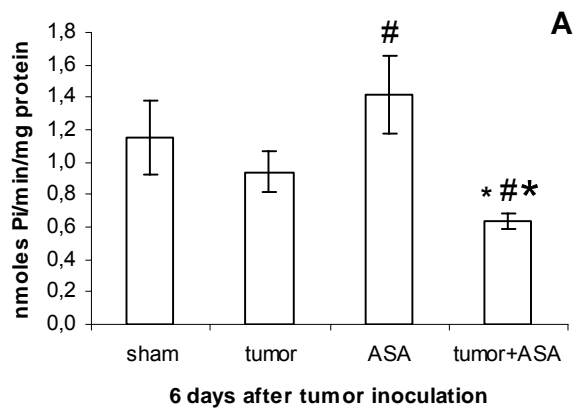
**Figure 3.** Effect of ASA treatment on AMP hydrolysis from rat *blood* serum 6 (A), 10 (B) and 15 (C) days after tumor inoculation. Bars represent mean  $\pm$  S.D. for at least five independent experiments. \* Significantly different from control group. # Significantly

different from tumor group. \*Significantly different from ASA group. Statistical analysis were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey multiple range test,  $P < 0.05$ , as significant

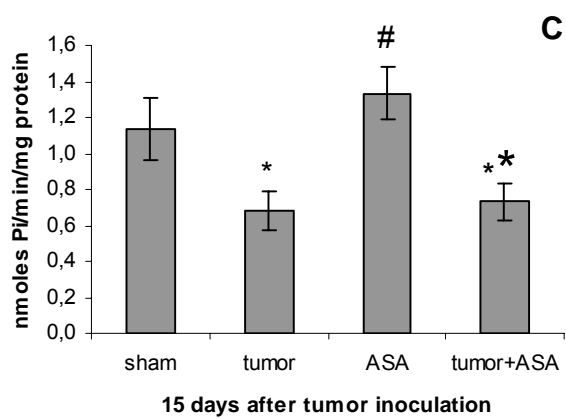
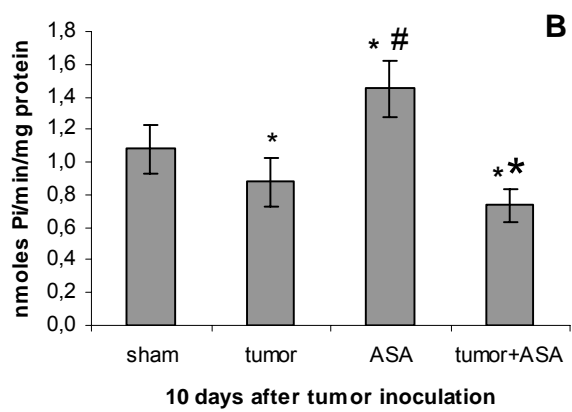
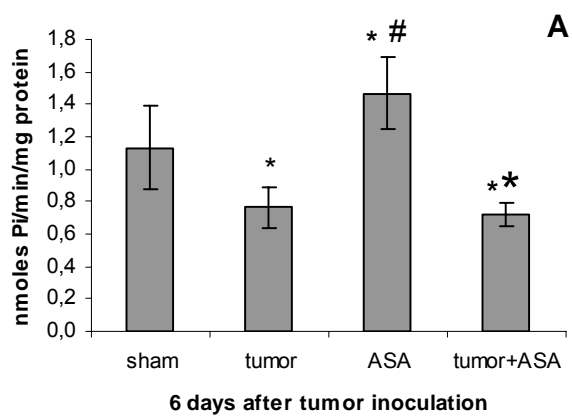
## **Figures**

### **Figure 1**

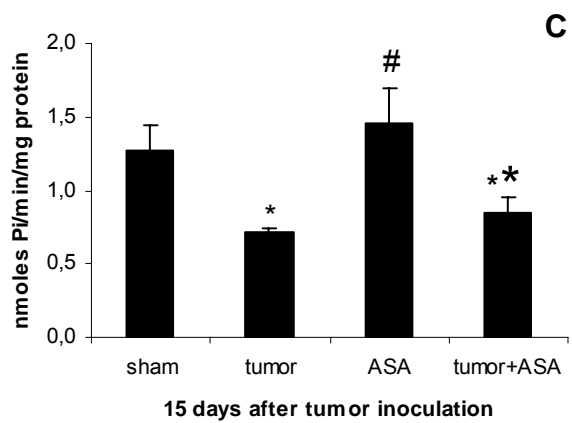
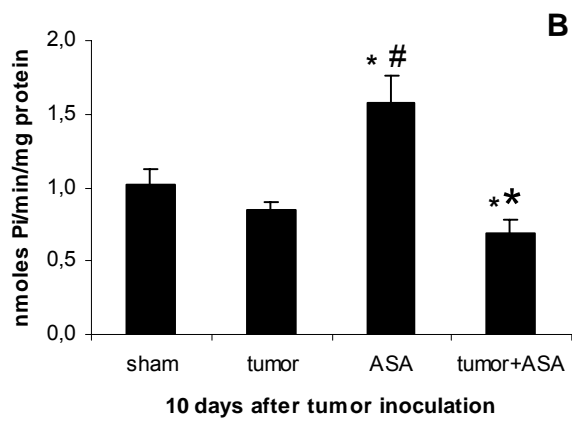
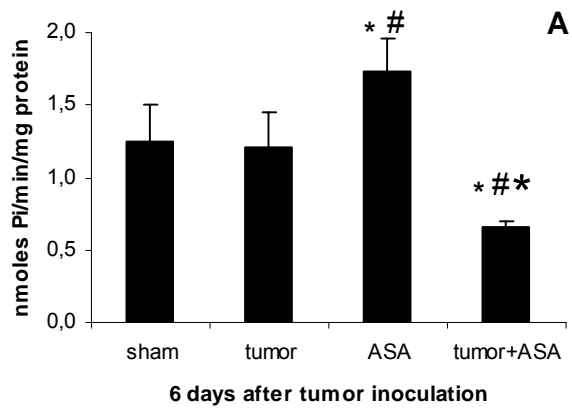




**Figure 2**



**Figure 3**



#### 4. DISCUSSÃO

#### *4.1. Considerações gerais*

Diversos estudos têm demonstrado um importante papel do ATP e da adenosina no desenvolvimento de tumores (Burnstock G, 2002; Spsychala et al., 2004). O ATP é conhecido por possuir efeitos citotóxicos às células tumorais em muitas linhagens de mamíferos (Chahwala & Cantley, 1984; Wiendl et al., 1998) e o seu envolvimento na morte das células tumorais via linfócitos T ativados também tem sido proposto (Correale et al., 1997). Por outro lado, a adenosina possui funções promotoras de tumorigênese por estimular o crescimento e a angiogênese tumorais, além de suprimir a resposta imune (Spsychala, 2000). O ATP e os receptores P2 são estruturas-chave nas fases de ativação da resposta imune, elucidando uma importante via de defesa do hospedeiro. Entretanto, a adenosina, principalmente via receptores  $A_{2A}$ , apresenta efeitos antiinflamatórios, demonstrando a relevância da sinalização purinérgica no sistema imune (Di Virgilio, 2007).

As nucleotidases são as enzimas responsáveis pelo controle dos níveis dos nucleotídeos extracelulares. A família das NTPDases hidrolisa os nucleotídeos di e trifosfatados a seus respectivos nucleotídeos monofosfatados, enquanto a 5'-nucleotidase hidrolisa estes últimos a seus respectivos nucleosídeos. Estas enzimas encontram-se ancoradas nas membranas celulares ou estão presentes na sua forma solúvel no meio intersticial (Zimmermann, 2001) e estão distribuídas em uma ampla variedade de tecidos e células.

*4.2. Ácido acetilsalisílico (AAS) altera a hidrólise dos nucleotídeos da adenina em linfócitos de ratos submetidos ao tumor de Walker 256 (Capítulo 1)*

Muitos estudos têm relacionado os antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) como agentes promissores para o tratamento de muitos tipos de câncer (Thun et al., 1993; Redlak et al., 2007). No capítulo 1, nós avaliamos o efeito da inoculação subcutânea de células tumorais de Walker 256 sobre a hidrólise dos nucleotídeos da adenina em linfócitos de ratos adultos e, posteriormente, o efeito do AAS na modulação da hidrólise destes nucleotídeos.

Para a execução da primeira parte experimental, realizamos a indução tumoral nos animais como previamente descrito por Buffon e colaboradores (2006) e os experimentos foram realizados 6, 10 e 15 dias após a inoculação do tumor, retirando-se os linfonodos mesentéricos. Os resultados apresentados nesta dissertação demonstraram um significativo aumento nas hidrólises de ATP (33 %) e ADP (46 %) 10 dias após a indução tumoral, sem qualquer alteração nos 6 e 15 dias. A hidrólise de AMP também foi investigada, porém, nenhuma modificação no perfil de hidrólise deste nucleotídeo foi observada.

Um aumento na expressão das ectonucleotidases de linfócitos já havia sido proposto como um mecanismo de proteção contra a lise celular induzida por ATP (Filippini et al., 1990b). Dombrowski et al. (1995) propuseram que esta atividade ATPásica não serviria apenas como mecanismo protetor, mas que também seria requerida para o desempenho de algumas funções linfocitárias, uma vez que o ATP extracelular parece estar envolvido na morte das células tumorais mediada por linfócitos T ativados (Di Virgilio et al., 1990). Isto explicaria o que parece ser um tanto contraditório: na presença do tumor, os linfócitos secretam ATP na tentativa de atingir e destruir a célula tumoral, e ao mesmo tempo, para se “defenderem” de uma possível toxicidade causada pelo aumento dos níveis deste nucleotídeo, aumentam a expressão das nucleotidases de membrana. Considerando a

importância dos linfócitos T no combate ao tumor, uma redução nos níveis de ATP parece necessária para manter estas células atuantes em sua função de defesa. Em contraste, um aumento nos níveis de adenosina poderia prejudicar a resposta imune promovida por estas células, uma vez que funciona como uma “barreira imunológica” que suprime a ativação das células T (Hoskin et al., 1994). Portanto, a modulação dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos pode desempenhar uma importante influência na progressão tumoral.

Estudos demonstraram que o tumor de Walker 256 cresce sem causar distúrbios fisiológicos aparentes por um certo período de tempo, que varia de 5 a 8 dias, sendo interrompido pelo início de um período de rápido crescimento tumoral e marcadas alterações metabólicas no hospedeiro (Rettori et al., 1995). Ainda reforçando os resultados obtidos nesta dissertação, estudos recentes realizados em nosso laboratório demonstraram que os genes das ectonucleotidases nestas células tumorais encontram-se mais expressos aos 10 dias após a indução do tumor quando comparados com a expressão observada aos 6 e 15 dias (Buffon et al. 2007b).

Após investigarmos o efeito da indução tumoral nas atividades ectonucleotidásicas de linfócitos, na segunda parte deste estudo nós buscamos avaliar um possível efeito do tratamento *in vivo* com AAS sobre a hidrólise dos nucleotídeos da adenina neste mesmo modelo. Os animais receberam a inoculação do tumor (dia 1) e foram tratados com a droga durante 9 dias. Os resultados demonstraram que o AAS *per se* levou a um aumento bastante expressivo das hidrólises de ATP (77%) e ADP (84%). Levando-se em conta as propriedades antiinflamatórias do AAS (Costello & Green, 1987; Fuchs et al., 2004) e sendo o ATP uma molécula proinflamatória (Ralevic & Burnstock, 1998b), uma diminuição nos níveis de ATP parece importante para a ação farmacológica da droga.

Cheung e colaboradores (1994) já haviam demonstrado que a aspirina *in vitro* aumentou a atividade NTPDásica em células endoteliais humanas.

No grupo tumor + AAS também foi verificado um aumento em torno de 20% nas hidrólises dos mesmos nucleotídeos em relação ao grupo tumor, porém nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos tumor + AAS e AAS. Apesar das alterações observadas na atividade NTPDásica após o tratamento com AAS na presença do tumor, a modulação dos níveis dos nucleotídeos mediada por linfócitos parece não estar contribuindo para os efeitos do AAS no desenvolvimento tumoral.

O efeito cinético promovido pela indução tumoral e/ou pelo tratamento com AAS pode ser consequência tanto de um controle transcricional quanto de mecanismos pós-traducionais. Com o objetivo de investigar as enzimas envolvidas no catabolismo dos nucleotídeos da adenina em linfonodos mesentéricos, nós avaliamos a expressão relativa das NTPDases1-3. Nossos resultados demonstraram que a indução tumoral foi responsável pelo aumento da expressão gênica das três enzimas analisadas, sugerindo a contribuição das NTPDases1, 2, e 3 para o aumento observado nas hidrólises de ATP e ADP neste grupo. Entretanto, o AAS afetou diferentemente a transcrição destas enzimas. Enquanto a expressão relativa da NTPDase2 não foi alterada, os níveis transcricionais das NTPDases1 e 3 foram diminuídos e aumentados, respectivamente, nos grupos AAS e tumor + AAS. Portanto, o aumento observado na atividade NTPDásica, pode ser resultado da ação de ambas as enzimas NTPDase1 e NTPDase3, apesar dos níveis de RNAm da NTPDase1 estarem diminuídos. Isto pode ocorrer, pois o maquinário de transcrição é continuamente controlado por um complexo sistema de sinalização, criando um ajuste no perfil de expressão gênica na célula. Assim, esta transdução pode ser exercida por proteínas e produtos de reações enzimáticas capazes de regular os fatores de transcrição (Krishna et al.,

2006). Este fenômeno é conhecido como “negative feedback loop” (Keseler et al., 2005; Salgado et al., 2001), na qual ocorre uma interface nas vias metabólica e gênica que poderia explicar o aumento na atividade com o concomitante diminuição na nos níveis de mRNA.

Os eventos pós-traducionais são outra possível explicação para as mudanças nas atividades enzimáticas após a indução tumoral e/ou a administração de AAS. As análises realizadas no NetPhosk (<http://www.cbs.dtu.dk/>) (Blom et al., 2004), mostraram a existência de sítios específicos para proteínas quinases na sequência das NTPDases. A seqüência da NTPDase 1 apresenta um possível sítio de fosforilação para PKC no resíduo 301 do aminoácido treonina. Nossa hipótese está de acordo com outros estudos que já demonstraram o envolvimento do AAS na ativação da PKC em células epiteliais humanas de câncer gástrico (Redlak et al., 2007). Baseado nos diferentes perfis de expressão das NTPDases1-3 observados nos linfonodos mesentéricos de ratos, é possível sugerir que o controle transcricional e os eventos pós-traducionais atuem em sinergismo para promover o aumento observado nas atividades ectonucleotidásicas.

Como conclusão geral, os resultados obtidos neste estudo mostram que a indução do tumor e/ou o tratamento com AAS foram capazes de modular os níveis transcricionais e as atividades enzimáticas das NTPDases. Os efeitos do AAS mediados por linfócitos parecem não estar envolvidos na progressão do câncer, mas nossos resultados podem contribuir para um melhor entendimento sobre a participação das ectonucleotidases no desenvolvimento tumoral.

*4.3. Ácido acetilsalicílico modula as atividades nucleotidásicas em soro de ratos adultos submetidos ao modelo tumoral de Walker 256 (Capítulo 2)*



No capítulo 2, nós avaliamos o efeito do AAS na hidrólise dos nucleotídeos da adenina em soro de ratos 6, 10 e 15 dias após a indução do tumor. Nós obtivemos uma redução significativa nas hidrólises de ATP (10 e 15 dias), ADP (em todos os períodos analisados) e AMP (apenas 15 dias) após a indução tumoral. Estes resultados estão de acordo com Buffon e colaboradores (2006), que já haviam encontrado uma diminuição nas hidrólises dos três nucleotídeos em todos os períodos testados. O aumento dos níveis de ATP na circulação foi, então, proposto como um mecanismo de proteção do hospedeiro contra o desenvolvimento do tumor de Walker 256.

O AAS aumentou significativamente a hidrólise de ATP aos 10 dias e as hidrólises de ADP e AMP aos 6 e 10 dias, após o início do tratamento. Apesar desses resultados, parece haver uma tendência do AAS em aumentar a hidrólise destes substratos também aos 15 dias. O ATP exerce efeitos pró-inflamatórios e a adenosina possui efeitos anti-inflamatórios e/ou imunossupressores (Di Virgilio, 2007). Por sua vez, o ADP promove a agregação plaquetária (Boarder & Huorani, 1998). Considerando as propriedades anti-inflamatórias e antiagregantes do AAS (Costello & Green, 1987; Fuchs, 2004), os resultados obtidos neste estudo parecem estar de acordo com os efeitos farmacológicos promovidos por essa droga.

Ao avaliarmos o grupo tumor + AAS, que constituiu o objetivo deste segundo capítulo, observamos que as hidrólises de ATP e AMP foram significativamente diferentes do grupo tumor, apenas aos 6 dias de tratamento. É válido salientar, que neste período, alterações significativas nas hidrólises destes nucleotídeos não tinham sido observadas na presença do tumor. A hidrólise de ADP não foi alterada em nenhum dos períodos testados, quando comparada com o grupo tumor. Buffon e colaboradores (2004) mostraram um

efeito inibitório do AAS *in vitro* sobre a atividade NTPDásica de plaquetas de ratos, sugerindo um mecanismo alternativo pelo qual o AAS exerce seus efeitos protetores contra o câncer, já que manteria na circulação níveis aumentados de ATP. Nossos resultados demonstraram que apenas no período inicial de tratamento (6 dias), o AAS foi capaz de modificar a resposta do tumor, reduzindo ainda mais as hidrólises de ATP e AMP, ou seja, aumentando os níveis de ATP (citotóxico) e reduzindo os níveis de adenosina (promotora de tumorigênese), na circulação. Assim, é tentador sugerir, que o AAS possa desempenhar um importante papel na prevenção da invasão do tumor, parecendo não ser mais efetivo após sua instalação e desenvolvimento no hospedeiro.

## **5. CONCLUSÕES**

Este estudo apresentou as seguintes conclusões gerais:

1. Observou-se um aumento significativo nas hidrólises dos nucleotídeos ATP e ADP em linfócitos de ratos adultos 10 dias após a indução do tumor de Walker 256. Nenhuma alteração nas hidrólises destes nucleotídeos foi obtida aos 6 e 15 dias após a indução tumoral. A hidrólise do AMP não foi modificada nos três períodos testados;
2. A administração de AAS promoveu um aumento nas hidrólises de ATP e ADP, em linfócitos, após 10 dias de tratamento, enquanto a hidrólise do AMP não foi alterada;
3. A administração de AAS aos ratos submetidos ao modelo tumoral (grupo tumor + AAS) aumentou as hidrólises de ATP e ADP, quando comparadas ao grupo tumor, porém, nenhuma diferença foi obtida entre os grupos tumor + AAS e AAS;
4. A expressão relativa das NTPDases1-3 em linfonodos mesentéricos foi aumentada na presença do tumor. O AAS afetou diferentemente a expressão relativa das enzimas nos linfonodos. Enquanto a transcrição da NTPDase2 não foi alterada, a expressão da NTPDases1 foi diminuída e a expressão da NTPDase3 foi aumentada;
5. A diminuição na hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em soro de ratos após a indução do tumor de Walker 256, previamente descrita, foi confirmada;
6. A administração de AAS aumentou significativamente as hidrólises dos três nucleotídeos em soro de ratos;
7. No grupo tumor + AAS observou-se que as hidrólises de ATP e AMP, em soro, foram significativamente diferentes do grupo tumor somente aos 6 dias de tratamento.

A partir dos resultados obtidos nesta dissertação, verificamos que o AAS promoveu diferentes efeitos sobre as enzimas que modulam os níveis dos nucleotídeos extracelulares em linfócitos e soro de ratos submetidos ao tumor de Walker 256. Portanto, este estudo contribui para um melhor entendimento dos mecanismos da sinalização purinérgica no desenvolvimento tumoral.

## **6. REFERÊNCIAS**

**ABBRACCHIO M.P., BURNSTOCK G.** Purinergic signaling: pathophysiological roles. *Jnp J Pharmacol* 78: 113-145, 1998.

**AGTERESCH H.J., REITVELD T., KERKHOFS L.G., VAN DEN BERG J.W., WILSON J.H., DAGNELIE P.C.** Beneficial effects of adenosine triphosphate on nutritional status in advanced lung cancer patients: a randomized clinical trial. *J Clin Oncol*: 20, 371-378, 1999.

**BARNES C.J., LEE M., HARDMAN W.E., CAMERON I.L.** Aspirin, age, and proximity to lymphoid nodules influence cell proliferation parameters in rat colonic crypts. *Cell prolifer* 28: 59-71, 1995.

**BLOM N., SICHERITZ-PONTEN T., GUPTA R., GAMMELTOFT S., BRUNAK S.** Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4: 1633-49, 2004.

**BOARDER M.R., HOURANI S.M.O.** The regulation of vascular functions by P2 receptor: multiple sites and multiple receptors. *TIPS* 19: 99-107, 1998.

**BORSELLINO G., KLEINWETFELD M., DI MITRI D., STERNJAK A., DIAMANTINI A., GIOMETTO R., HÖPNER S., CENTONZE D., BERNARDI G., DELL'ACQUA M.L., ROSINI P.M., BATTISTINI L., RÖTZSCHKE O., FALK K.** Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup>Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Bood* 110: 1225-1232, 2007.

**BUFFON A., RIBEIRO V.B., FURSTENAU C.R., BATTASTINI A.M.O, SARKIS J.J.F.** Acetylsalicylic acid inhibits ATP diphosphohydrolase activity by platelets from adult rats. *Clinica Chimica Acta* 349: 53–60, 2004.

**BUFFON A., RIBEIRO V.B., SCHANOSKI A.S., SARKIS J.J.F.** Diminution in adenine nucleotides hydrolysis by platelets and serum from rats submitted to Walker 256 tumor. *Mol Cell Biochem* 281: 189-195, 2006.

**BUFFON A., RIBEIRO V.B., WINK M.R., CASALI E.A., SARKIS J.J.F.** Nucleotide metabolizing ecto-enzymes in Walker 256 tumor cells: Molecular identification, kinetic characterization and biochemical properties. *Life Sciences* 80: 950-958, 2007.

**BUFFON A., WINK M.R., RIBEIRO, V.B., CASALI E.A., LIBERMANN T.A., ZERBINI L.F., ROBSON S.C., SARKIS, J.J.F.** NTPDase and 5' nucleotidase expression profiles and the pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor. *Biochim Biophys Acta* 1770: 1259-1265, 2007b.

**BURNSTOCK G.** Introduction: P2 receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4: 793-803, 2004.

**BURNSTOCK G.** Overview of P2 receptors: possible functions in immune cells. *Drug Dev* 45: 207-213, 2001

**BURNSTOCK G.** Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 58: 58-86, 2006.

**BURNSTOCK G.** Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signaling. *Clin Med* 2: 45-53, 2002.

**BURNSTOCK G.** Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-581, 1972.

**BURNSTOCK G., CAMPBELL G., SATCHELL D., SMYTHE A.** Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br j Pharmacol* 40: 668-688, 1970.

**CANBOLAT O., DURAK I., CETIN R., KAVUTCU M., DEMIRCI S., OZTURK S.** Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. *Breast Cancer Res* 37: 189-193, 1996.

**CHAHWALA S.B., CANTLEY L.C.** Extracellular ATP induces ion fluxes and inhibits growth of friend erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 259:13717-13722, 1984.

**CHAN K.M., DELFERT D., JUNGER K.D.** A direct colorimetric assay for Ca<sup>+2</sup>-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157: 375-380, 1986.

**CHEUNG P.K., VISSER J., BAKKER W.W.** Upregulation of antithrombotic ectonucleotidases by aspirin in human endothelial cells in-vitro. *J Phaem Pharmacol* 46: 1032-1034, 1994.

**CORREALE P., TAGLIAFERRI P., GUARRASI R., CARAGLIA M., GIULIANO M., MARINETTI M.R., BIANCO A.R., PROCOPIO A.** Extracellular adenosine 5' triphosphate involvement in the death of LAK-engaged human tumor cells via P2X-receptor activation. *Immunol Lett* 55: 69-78, 1997.

**COSTELLO P.B., GREEN, F.A.** The extracellular control of intracellular aspirin hydrolysis. *Arthritis Rheum* 30: 412-418, 1987.

**CRONSTEIN B.N.** Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Cell Physiol* 76: 5-13, 1994.

**CRONSTEIN B.N., KRAMER S.B., WEISMANN G., HIRSSCHHORN R.** Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med* 158: 1160-1177, 1983.

**CZAJKOWSKI R., BARANSKA J.** Cross-talk between the ATP and ADP nucleotide receptor signaling pathways in glioma C6 cells. *Acta Biochim Polonica* 49: 877-889, 2002.

**DI VIRGILIO F.** Purinergic signaling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signalling* 3: 1-3, 2007.

**DI VIRGILIO F., PIZZO P., ZANOVELLO P., BRONTE V., COLLAVO D.**

Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 11: 274-277, 1990.

**DIKSHIT P., CHATTERJEE M., GOSWAMI A., MISHRA A., JANA N.R.** Aspirin induces apoptosis through of proteasome function. *J Biol Chem* 281: 29228-29235, 2006.

**DOMBROWSKI K.E., KE Y., THOMPSON L.F., KAPP J.A.** Antigen recognition by CLT is dependent upon ectoATPase activity. *J Immunol* 154: 6227-6237, 1995.

**DRURY A.N., SZENT-GYÖRGI A.** The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237, 1929.

**DURAK I., CETIN R., CANBOLAT O., CETIN D., YURTARSLANI Z., UNAL A.** Adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase and cytidine deaminase activities in gastric tissues from patients with gastric cancer. *Cancer Lett* 84: 199-202, 1994.

**DZHANZUGAZYAN K.N., KIRKIN A.F., STRATEN P.T., ZEUTHEN J.** Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett* 430: 227-230, 1998.

**EARLE W.R.A.** Study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. *Am J Cancer* 24: 566-612, 1935.

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

**FIEDLER J.L., POLLARD H.B. & ROJAS E.** Quantitative analysis of depolarisation-induced ATP release from mouse brain synaptosomes: external calcium dependent and independent process. *J. Memb. Biol.* 127: 21-33, 1992.



**FILIPPINI A., TAFFS R.E., AGUI T., SITKOVSKY M.V.** Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes, protection of the cytolytic effects of extracellular ATP. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 334–340, 1990b.

**FILIPPINI A., TAFFS R.E., SITKOVSKY M.V.** Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc Natl Acad Sci* 87: 8267-8271, 1990.

**FUCHS F.D. ET AL.** *Farmacologia Clínica Fundamentos da Terapêutica Racional*. 3th ed, Brasil: Rio de Janeiro, 2004.

**GESSI S., MERIGUI S., VARINI K., CATTABRIGA E., BENINI A., MIRANDOLA P., LEUNG E., MAC LENNAN S., FEO C., BARALDI S., BOREA P.A.** Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A(3) adenosine subtype. *J Cell physiol* 211: 826-836, 2007.

**GODING J., GROBBEN B. AND SLGERS H.** Physiological and pathophysiological functions of the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638: 1-19, 2003.

**GUAITANI A., TORRE P.D., MORASCA L., PINTUS C., BARTOSEK I., GARATTINI S.** Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor induced anorexia and cachexia. *Oncology* 39:173-178, 1982.

**HARADA H., CHAN C.M., LOESCH A., UNWIN R., BUURNSTOCK G.** Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney Inter* 57: 949-958, 2000.

**HOLTON P.** The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145: 494-504, 1959.

**HOSKIN D.W., REYNOLDS T., BLAY J.** Adenosine as a possible inhibitor of killer T-cell activation in the microenvironment of solid tumors. *Int J Cancer* 59: 854-855, 1994.

**IWAMA M.C.F.** Carcino-sarcoma 256 de Walker: disseminação metastática em duas linhagens do tumor. *Rev Bras Pesq Biom Biol* 12: 147-153, 1979.

**IWAMA M.C.F., FRANCO M.F., LEMONICA L.** Tumor de Walker. Um bom modelo experimental para o ensino de neoplasias. *Ciência e Cultura* 23: 267-271, 1973.

**JIANG M.C., LIAO C.F., LEE P.H.** Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production and inhibits in vitro invasion of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 671-677, 2001.

**KANSAS G.S., WOOD G.S., TEDDER T.F.** Expression, distribution and biochemistry of human CD39: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol* 146: 2235-2244, 1991.

**KRISHNA S., ANDERSSON A.M., SEMSEY S., SNEPPEN K.** Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. *Nucleic Acids Research* 34: 2455–2462, 2006.

**LAVOIE E.G., KUKULSKI F., LEVESQUE S.A., LICKA J., SEVIGNY J.** Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem Pharmacol* 67: 1917-1926, 2004.

**LEMMENS R., KUPERS L., SEVIGNY J., BEAUDOINN A.R., GRONDIN G., KITTEL A., WAELKENS E., VANDUFFEL L.** Purification, characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase in porcine kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: 978-988, 2000.

**MALISZEWSKI C.R., DELESPESE G.J., SCHOEBORN M.A.** The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* 153: 3574-3583, 1994.

**MASAHIKO T., KAWANO S., TSUJI S., SAWAOKA H., HORI M., DUBOIS R.N.** Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705–716, 1998.

**MORRISON S.B.** Water intake and exchange and hydration of rats during growth of Walker 256 carcinisarcoma. *J Nat Cancer Inst* 46: 825-830, 1971.

**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. *J Neuro Oncol* 64: 211-218, 2003.

**MUJJOMDAR M., HOSKIN D., BLAY J.** Adenosine stimulation of the proliferation of colorectal carcinoma cell lines. Roles of cell density and adenosine metabolism. *Biochem Pharmacol* 66:1737-1747, 2003.

**OSÉS J. P., CARDOSO C.M., GERMANO R.A., KIRST I.B., RUCKER B., FURSTENAU C., WINK M.R., BONAN C.D., BATTASTINI A.M.O., SARKIS J.J.F.** Soluble NTPDase: additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci* 74: 3275-3284, 2004.

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

**RALEVIC V., BURNSTOCK G.** Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect* 16: 133-140, 1998.

**RAO C.V., REDDY B.S.** NSAIDs and chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets* 4: 29-42, 2004.

**RAPPAPORT E.** Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest growth in the S phase of the cell cycle. *J Cell Physiol* 114: 279-283, 1983.

**REDLAK M.J., POWER J.J., MILLER T.A.** Aspirin-induced apoptosis in human gastric cancer epithelial cells: relationship with protein kinase C signaling. *Dig Dis Sci* 52: 810-816, 2007.

**RETTORI O., VIEIRA-MATOS A.N., TAHIN Q.S.** Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by the Walker 256 tumor progression in rats. *Tumori* 81: 370-377, 1995.

**RICHARDSON P.J. & BROWN S.J.** ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem*, 48: 622-630, 1987.

**ROSSEMBERG L., PALMER J., ZAUBERG A.G., WARSHAUER M.E., STOLLEY P.D., SHAPIRO S.** A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 83: 355–358, 1991.

**SADEJ R., SPYCHALA J., SKLADANOWSKI A.C.** Expression of ecto-5'-nucleotidase in cells lines from various stages of human melanoma *Melanoma Res* 16: 213-222, 2006.

**SAKURA H., NAGASHIMA S., NAGASHIMA A., MAEDA M.** Characterization of fetalserum 5'-nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Trombosis Res* 91: 83-89, 1998.

**SARKIS J.J.F., SALTO C.** Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res Bull* 26: 871-876, 1991.

- SCHADECK R.J., SARKIS J.J., DIAS R.D., ARAÚJO H.M., SOUZA D.O.** Synaptosomal apyrase in the hypothalamus of adult rats. *Braz J Med Biol Res* 22: 303-314, 1989.
- SCHNEIDER C., WIENDL H., OGILVIE A.** Biphasic cytotoxic mechanism of extracellular ATP on U-937 human histiocytic leukemia cells: involvement of adenosine generation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1538: 190-205, 2001.
- SEED M., BROWN J.R., FREEMANTLE C.** The inhibition of colon-26 adenocarcinoma development and angiogenesis by topical diclofenac 2.5% hyaluronan. *Cancer Res* 57: 1625–1629, 1997.
- SEVIGNY J., LEVESQUE F.P., GRONDIN G., BEAUDOIN A.R.** Purification of the blood vessel ATP diphosphoydrolase, identification and localization by immunological techniques. *Biochim Biophys Acta* 1334: 73-88, 1997.
- SPHYCHALA J., LAZAROWSKI E., OSTAPKOWICZ A., AYSCUE L.H., JIN A., MITCHELL B.S.** Role of estrogen in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clinical cancer Res* 10: 708-717, 2004.
- SPRANZI E., DJEU J.Y., HOFFMAN S.L., EPLING-BURNETTE P.K., BLANCHARD D.K.** Lysis of human monocytic leukemia cells by extracellular adenosine triphosphate: mechanism and characterization of the adenosine triphosphate receptor. *Blood* 82: 1578-1585, 1993.
- SPYCHALA J.** Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 87: 161-173, 2000.
- STEFAN C., JANSEN S., BOLLEN M.** Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signalling* 2: 361-370, 2006.

**STEFAN C., JANSEN S., BOLLEN M.** NPP-type ectophosphodiesterases:unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 30: 542-550, 2005.

**THIEL M., CALDWELL C.C., SITKOVSKY M.V.** The critical role of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect* 5: 515-526, 2003.

**THUN M.J., NAMBOODIRI M.M., CALLE E.E., FLANDERS W.D., HEALTH C.W. JR.** Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 53: 1322-1327, 1993.

**TOAL J.N., MILLAR F.K., BROOKS R.H., WHITE J.** Sodium retention by rats bearing the Walker carcinosarcoma 256. *Am J Phys* 200: 175-181, 1960.

**VAN REES B.P., RISTIMAKI A.** Cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of the gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 36: 897-903, 2001.

**VUADEN FC, COGNATO GP, BONORINO C, BOGO MR, SARKIS JJF, BONAN CD.** Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats. *Life Sciences* 80: 1784-1791, 2007.

**WANG D., DUBOIS R.N.** Prostaglandins and cancer. *Gut*: 55: 115-22, 2006.

**WANG T.F., ROSEMBERG P.A., GUIDOTTI G.** Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (DC39) gene. *Mol Brain Res* 47: 295-302, 1997.

**WEISMAN G.A., LUSTIG K.D., LANE E., HUANG N., BELZER I., FRIEDBERG I.** Growth inhibition of transformed mouse fibroblast by adenine nucleotides occurs via generation of extracellular adenosine. *J Biol Chem* 263: 12367-12372, 1988.

**WHITE N., BURNSTOCK G.** P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 27, 211-217, 2006.

**WIENDL H.S., SCHNEIDER C., OGILVIE A.** Nucleotide metabolizing ectoenzymes are upregulated in A431 cells periodically treated with cytostatic ATP leading to partial resistance without preventing apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1404: 282-298, 1998.

**YEGUTKIN G.G.** Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochem* 62: 619-622, 1997.

**ZIMMERMANN H.** 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285: 345-365, 1992.

**ZIMMERMANN H.** Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 49: 587-618, 1996.

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

**ZIMMERMANN H.** Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309, 2000.

**ZIMMERMANN H., BRAUN N.** Extracellular metabolism of nucleotides in the central nervous system. *J Auton Pharmacol* 16: 397-400, 1996.