

Efeitos antiproliferativos da metformina e adenosina em glioblastoma

Versão final após defesa

Francisca Isabel Canelas Oliva Teles

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Helena Tomás Marcelino Lopes
Co-orientador: Prof. Doutor José Francisco da Silva Cascalheira

novembro de 2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar, expresso o meu agradecimento à minha orientadora Professora Doutora Helena Marcelino, pela oportunidade que me deu ao desenvolver este projeto, pela sua orientação, por todos os conhecimentos científicos transmitidos, na vertente prática e teórica, ao longo do nosso percurso em conjunto, pela dedicação, empenho e disponibilidade que sempre me demonstrou. Agradeço também pela compreensão e motivação que me deu quando as coisas correram menos bem.

Ao meu co-orientador Professor Doutor José Francisco Cascalheira, agradeço o acompanhamento que tive ao longo do ano sempre que necessário, pelas suas opiniões que se mostraram uma mais-valia para a execução deste trabalho. Agradeço também pelos conhecimentos científicos transmitidos ao longo deste ano, principalmente na área da estatística.

Às colegas de laboratório, Ana Raquel Costa, Ana Raquel Brito, Sandra Rocha, Melissa Mariana, Joana Feteiro e Micaela Riscado, agradeço por toda a ajuda e disponibilidade com que sempre me brindaram quando recorria ao seu auxílio. Agradeço também aos restantes colegas do CICS com que me cruzei ao longo deste percurso, que de uma maneira ou de outra me ensinaram tanto.

Aos meus colegas de ano, Carolina, Maria Inês, Rui e Manuel, obrigada por me “acolherem” e por todos os momentos de descontração e entreajuda que existiram ao longo deste ano.

À Margarida e à Alexandra, um enorme obrigada pela vossa amizade, pelas conversas, pela preocupação constante, por tudo. Foram um enorme apoio, mesmo quando o desânimo era maior que tudo o resto. Alexandra, tu acompanhaste-me desde o meu 1º ano nesta cidade e se cheguei onde cheguei deveu-se e muito à tua ajuda ao longo destes anos. Mais uma vez, um enorme obrigada a ambas, devo-vos muito.

Aos meus amigos da Covilhã, Henha, Diogo, Rique, Fafe, uau. Não encontro palavras para descrever o quão especiais são para mim, desde o auditório até hoje estiveram presentes e acompanharam-me em todos os momentos, melhores e piores, que por mim passaram, sem nunca duvidarem das minhas capacidades, mesmo quando eu própria duvidava delas. Convosco passei os melhores anos da minha vida, obrigada por essa oportunidade. Henha, um obrigada especial a ti, que sempre foste o meu pilar.

Aos meus amigos de sempre, Joana e Gonçalo, por não deixarem que a distância seja mais do que um número, por todos os conselhos que têm sempre prontos para me dar, exatamente no momento certo.

Em especial, aos meus pais e à minha irmã, agradeço do fundo do coração por todo o apoio que sempre me deram e por me terem proporcionado esta oportunidade. Por todas as conversas e mimos, por sempre apoiarem nas minhas decisões, por me darem na cabeça quando assim precisava, por me aturarem. Mas principalmente por estarem sempre presentes para mim quando preciso, mesmo longe de casa, sem cobrar nada em troca sem ser amor.

A toda a restante minha família, ao Quim e à Cristina, agradeço todas as palavras de apoio que me deram e dão constantemente. À minha avó e à minha tia, espero que estejam orgulhosas da vossa menina.

Ao meu Leandro, obrigada. Pela paciência inesgotável, pelo amor e amizade, pela companhia, por todos os sacrifícios que fazes e fizeste por mim nesta fase da minha vida. Obrigada por nunca me deixares desistir, por saberes como me fazer sorrir quando só me apetece chorar, por me fazeres ver a vida de uma outra perspetiva. Tenho a certeza que sem ti não tinha conseguido completar esta etapa tão importante.

Por fim, a todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, o meu mais sincero obrigada.

Resumo

O Glioblastoma multiforme (GBM) é um tumor cerebral, sendo o tipo de glioma mais comum, agressivo e com pior prognóstico. Até à data, as terapêuticas existentes apenas atuam de forma paliativa, sendo o tempo médio de sobrevivência dos pacientes apenas de 12 a 16 meses. A Metformina (Met) é um fármaco utilizado em pacientes com diabetes tipo 2, que tem vindo a demonstrar propriedades antitumorais em diversos casos, entre eles no GBM. A Adenosina (Ado) é um ribonucleósido endógeno classificado como neuromodulador, com capacidade de regular a neurotransmissão, de proteger contra danos neurotóxicos e tem ainda capacidade de modular a plasticidade sináptica. Em situação de hipoxia, a Ado atinge concentrações elevadas, podendo produzir as suas ações por ativação de recetores ou por mecanismos epigenéticos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade antiproliferativa da Met em GBM, quer de forma isolada, quer quando os níveis de Ado foram aumentados por aplicação de Ado exógena ou por inibição da sua metabolização, através do uso de um inibidor da cinase da adenosina (ADK), ABT-702.

Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação de Met diminui a proliferação celular em linhas celulares de GBM e em astrócitos humanos (AH) normais, tendo este efeito sido atenuado na presença de um inibidor da AMPK, o composto C. Por outro lado, o aumento dos níveis intracelulares de Ado resultante da ação do inibidor da ADK, ABT-702, provocou uma diminuição da proliferação celular em GBM e em AH, tendo-se também observado que a aplicação simultânea de ABT-702 e Met produziu um efeito cumulativo antiproliferativo. Tais observações sugerem que o efeito antiproliferativo da Met envolve, pelo menos em parte, a ativação da AMPK e que a aplicação conjugada da Met e de um inibidor da ADK possam produzir um efeito antitumoral cumulativo em GBM. No entanto, será necessário desenvolver e aprofundar estes estudos de forma a se conseguir entender melhor os mecanismos celulares que possam influenciar a via glicolítica no GBM e os seus efeitos ao nível da reversão do Efeito de *Warburg*.

Palavras-chave

Glioblastoma; Adenosina; Metformina; ABT-702; Composto C; Viabilidade Celular.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is a brain tumor, being the most common, aggressive type of glioma, and with the worst prognosis. To date, existing therapies only work palliatively, with the average survival time of patients being only 12 to 16 months. Metformin (Met) is a drug used in patients with type 2 diabetes, which has been showing antitumor properties in several cases, including in GBM. Adenosine (Ado) is an endogenous ribonucleoside classified as a neuromodulator, with the ability to regulate neurotransmission, protect against neurotoxic damage and also has the ability to modulate synaptic plasticity. In situations of hypoxia, Ado reaches high concentrations and can produce its actions by activating receptors or by epigenetic mechanisms.

The aim of the present study was to evaluate the antiproliferative capacity of Met in GBM, either alone, or when Ado levels were increased by application of exogenous Ado or by inhibition of its metabolization, through the use of an adenosine kinase inhibitor (ADK), ABT-702.

The results obtained demonstrated that the application of Met decreases cell proliferation in GBM cell lines and in normal human astrocytes, this effect being attenuated in the presence of an AMPK inhibitor, compound C. On the other hand, the increase of the intracellular levels of Ado resulting from the action of the ADK inhibitor, ABT-702, caused a decrease in cell proliferation in GBM and human astrocytes, and it was also observed that the simultaneous application of ABT-702 and Met produced a cumulative antiproliferative effect. These observations suggest that the antiproliferative effect of Met involves, at least in part, the activation of AMPK and that the conjugate application of Met and an ADK inhibitor can produce a cumulative antitumor effect in GBM. However, it will be necessary to develop and deepen these studies in order to better understand the cellular mechanisms that may influence the glycolytic pathway in GBM and its effects on the reversal of the Warburg Effect.

Keywords

Glioblastoma; Adenosine; Metformin; ABT-702; Compound C; Cell Viability.

Índice

Capítulo 1	1
1 Introdução	1
1.1 Gliomas	1
1.2 Glioblastoma multiforme	1
1.2.1 Efeito de Warburg	2
1.2.2 Influência da hipoxia no microambiente tumoral	3
1.2.3 Homeostase energética: importância da AMPK	3
1.3 Metformina	7
1.3.1 Mecanismos de ação antitumoral da Metformina	8
1.3.2 Ação da metformina: estudos em GBM	10
1.4 Adenosina	11
1.4.1 Metabolismo e origem da adenosina	13
1.4.2 Efeitos da adenosina no sistema nervoso e relação com GBM	15
1.4.3 ADK e ABT-702	17
1.5 Linhas celulares de glioblastoma	18
Capítulo 2	21
2 Objetivo do Trabalho	21
Capítulo 3	23
3 Material e Métodos	23
3.1 Células	23
3.2 Cultivo celular e incubação com fármacos	23
3.2.1 Expansão e contagem de células	23
3.2.2 Incubação com fármacos	25
3.3 Ensaios de viabilidade celular	28
3.4 Expressão gênica	29
3.4.1 RNA total	29
3.4.2 Síntese de cDNA	30

3.4.3	PCR convencional	31
3.4.4	PCR <i>real-time</i> : curva de eficiência para a ciclina D.....	32
3.5	Análise estatística	33
Capítulo 4	35
4	Resultados	35
4.1	Determinação do EC ₅₀ para a Metformina	35
4.2	Estudo do efeito combinado da metformina e adenosina/ABT-702 na viabilidade celular de linhas de glioblastoma	37
4.3	Estudo do efeito combinado de metformina e ABT-702 na comparação da viabilidade celular em astrócitos.....	39
4.4	Análise: possibilidade de choque osmótico provocado pela metformina?	41
4.5	Mecanismo de ação da metformina: ensaio com composto C	44
4.6	Expressão génica	46
4.6.1	Amplificação dos produtos de PCR para os genes da ciclina D e β -actina.....	46
4.6.2	Curva de eficiência para a ciclina D por PCR <i>real-time</i>	47
Capítulo 5	49
5	Discussão de resultados	49
Capítulo 6	53
6	Conclusões e Perspetivas Futuras	53
Capítulo 7	55
7	Referências Bibliográficas	55

Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura química do composto C.....	4
Figura 2- Efeitos pró- e antitumorais da AMPK.....	5
Figura 3 - Estrutura química da metformina.	7
Figura 4 - Alvos intracelulares da ação da metformina.....	10
Figura 5 - Estrutura química da adenosina.	12
Figura 6 - Metabolismo da adenosina.	15
Figura 7 - Mecanismo proposto para a inibição da proliferação astrocitária induzida pela adenosina, independente de recetores.	16
Figura 8 - Estrutura química do ABT-702.....	18
Figura 9 - Representação temporal dos ensaios de MTT.	26
Figura 10 - Representação esquemática do processo experimental, desde a cultura celular à leitura de absorvância.	29
Figura 11 - Estudo de viabilidade celular em linhas de GBM, com diferentes concentrações de Met.	36
Figura 12 - Estudo de viabilidade celular das linhas de GBM, em percentagem, após tratamento com Met, Ado e ABT-702.....	38
Figura 13 - Estudo de viabilidade celular de AH, em percentagem, após tratamento com Met e ABT-702.....	40
Figura 14 - Estudo de viabilidade celular das linhas de GBM, em percentagem, para determinação de choque osmótico, após tratamento com Met e ABT-702.....	43
Figura 15 - Percentagem de inibição da viabilidade celular em GBM causada pela Met, na ausência e presença de cC.....	45
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 2%, dos produtos de PCR dos genes para a ciclina D e β -actina.	47

Figura 17- Curva de eficiência obtida para o gene da ciclina D..... 48

Lista de Tabelas

Tabela 1- Composição do meio de criopreservação das diferentes células em estudo... 23

Tabela 2- Sequências dos primers utilizados para o gene da ciclina D e da β -actina. ... 32

Lista de Acrónimos

ABT-702	4-amino-5-(3-bromofenil)-7-(6-morfolinopiridin-3-il) pirido[2,3-d]pirimidina
ADA	Desaminase da adenosina
ADK	Cinase de adenosina
ADK-L	Cinase de adenosina nuclear
ADK-S	Cinase de adenosina citoplasmática
Ado	Adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
AGS	Suplemento de crescimento de astrócitos
AH	Astrócitos humanos
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Cinase de proteína ativada por adenosina monofosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	Proteína pró-apoptótica membro da família Bcl-2
Bcl-XL	Proteína do linfoma de células B extra grande
cAMP	AMP cíclico
cC	Composto C / dorsomorfina
CD39	Apirase/EctoATP difosfohidrolase/ADPase
CD73	5'-nucleotidase
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAG	Diacilglicerol
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DIABLO	Proteína de ligação direta a inibidores de proteínas apoptóticas com baixo ponto isoelétrico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EC50	<i>Half maximal effective concentration</i>
ECT1	Complexo I da cadeia transportadora de eletrões
ENT	Proteínas membranares transportadoras de nucleósidos
FSB	Soro fetal bovino
GBM	Glioblastoma multiforme

GLUT 1	Transportador 1 de glucose
GLUT 3	Transportador 3 de glucose
HGPRT	Transferase do fosforibosilo da hipoxantina-guanina
HIF	Fator de transcrição induzível por hipoxia
HIF-1 α	Subunidade 1 α de HIF
HK2	Hexocinase 2
IAP	Inibidor de proteínas apoptóticas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina
IGF-1R	Recetor do fator de crescimento semelhante a insulina
IMP	Monofosfato de inosina
IP3	1,4,5-trisfosfato de inositol
IR	Recetor de insulina
ITU	5-iodotubercidina
LDH	Desidrogenase do lactato
LDHA	Desidrogenase do lactato isoforma A
LKB1	Cinase de proteína do fígado B1
LSD	<i>Fisher's least significant difference</i>
MAPK	Cinases de proteína ativadas por mitogénios
Met	Metformina
mTOR	Proteína alvo da rapamicina nos mamíferos
mTORC1	Complexo 1 da mTOR
MTT	<i>Thiazolyl blue tetrazolium bromide</i>
NADPH	Forma reduzida do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
OCT	Transportadores catiónicos orgânicos
OXPHOS	Fosforilação oxidativa mitocondrial aeróbica
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDH	Desidrogenase do piruvato
PIP2	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PIP3	3,4,5-trisfosfato de fosfatidilinositol
PI3K/Akt/mTOR	3-cinase do fosfatidilinositol/cinase B de proteína/ proteína alvo da rapamicina nos mamíferos
PK	Cinase do piruvato
PKA	Cinase A de proteína
PLC	Fosfolipase C
P/S	Solução de antibiótico penicilina/streptomomicina

qPCR	<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rRNA	RNA ribossómico
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAHH	Hidrolase da S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SN	Sistema nervoso
SOD	Dismutase superóxido
TNS	<i>Trypsin Neutralization Solution</i>
TRI	<i>TRI Reagent</i>
VEGF	Fatores de crescimento do endotélio vascular
WHO	<i>World Health Organization</i>
XO	Oxidase da xantina

Lista de publicações científicas

Marcelino, H., Carvalho, T. M. A., Tomás, J., Teles, F. I., Honório, A. C., Rosa, C. B., Costa, A. R., Costa, B. M., Santos, C. R. A., Sebastião, A. M., & Cascalheira, J. F. (2021). Adenosine inhibits cell proliferation differently in human astrocytes and in glioblastoma cell lines. *Neuroscience*, 467, 122–133.

- Integram o referido artigo alguns resultados obtidos no estudo da secção 4.2 “Estudo do efeito combinado da metformina e adenosina/ABT-702 na viabilidade celular de linhas de glioblastoma”, páginas 37 à 39 da presente dissertação.

Capítulo 1

1 Introdução

1.1 Gliomas

Os gliomas são o tipo de tumores cerebrais primários humanos mais comum, cuja origem pode derivar de células estaminais neuronais primitivas, células progenitoras gliais ou astrócitos maduros não diferenciados, oligodendrócitos ou células ependimárias (Waker & Lober, 2019). A incidência na população é mais notória com o aumento da idade, sendo que, em média, os diagnósticos são realizados por volta dos 65 anos, com recurso a exames neurológicos, de imagem e biópsias. Este tipo de tumor afeta sobretudo o sexo masculino, numa razão 1.7 vezes superior à incidência registada no sexo oposto (Le Rhun *et al.*, 2019). A nível mundial, regiões como a Europa Central e Ocidental e Ásia Oriental são as que apresentam uma maior taxa de incidência (Patel *et al.*, 2019).

1.2 Glioblastoma multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais comum de glioma, representando cerca de 50-55% dos casos, desenvolvendo-se a partir de células da glia - astrócitos e oligodendrócitos – e células estaminais neuronais (Sasmita *et al.*, 2018; Strickland & Stoll, 2017). De acordo com a *World Health Organization* (WHO), o GBM é classificado como astrocitoma de grau IV, a forma de glioma mais agressiva e com pior prognóstico (Strickland & Stoll, 2017). A estimativa de tempo de sobrevivência para pacientes diagnosticados com esta patologia é de cerca de 12 a 16 meses (Agnihotri & Zadeh, 2016; Sasmita *et al.*, 2018; Wolf *et al.*, 2010). Uma das principais características do GBM é a capacidade que este tipo de tumor tem de invadir e migrar para tecidos saudáveis, sendo este o principal obstáculo à terapêutica e também a principal causa de recidiva (Huang *et al.*, 2018).

A agressividade deste tipo de tumores está relacionada com a enorme capacidade de sobrevivência, mas também com a elevada resistência a terapêuticas. O tratamento convencional consiste numa combinação de terapias, que inclui cirurgia para remoção da massa tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia, esta última recorrendo a temozolomida (Bryukhovetskiy *et al.*, 2018; Sasmita *et al.*, 2018). A temozolomida é um

agente alquilante usado no tratamento de pacientes com GBM e astrocitoma, não sendo de todo uma terapia eficaz devido à variabilidade genética da população, que, por vezes se traduz em resistência a este fármaco. No entanto, e apesar da aplicação destas terapêuticas em casos de GBM, não há uma cura eficaz para esta patologia (Sasmita *et al.*, 2018).

Devido ao desenvolvimento tecnológico na área da medicina e da biologia molecular, é hoje possível distinguir entre formas primárias e secundárias de GBM, de acordo com a sua origem. Formas primárias desenvolvem-se espontaneamente, devido, por exemplo, a alterações epigenéticas; por outro lado, formas secundárias de GBM tendem a evoluir a partir de gliomas com menor grau de agressividade (nomeadamente graus I a III) (Bryukhovetskiy *et al.*, 2018). Através de amostras teciduais de pacientes, foi possível identificar geneticamente vários subtipos (fenótipos) de GBM, tendo por base alterações características recorrentes: clássico, mesenquimal, pro-neural e neural (Strickland & Stoll, 2017; Waker & Lober, 2019).

1.2.1 Efeito de Warburg

O GBM, como a generalidade dos tumores, apresenta mecanismos de adaptação tumoral. Estes mecanismos assentam em alterações genéticas e epigenéticas variadas que lhes conferem vantagens em relação às células normais, tais como, sobreviver em microambientes desfavoráveis, proliferar e invadir outros tecidos. Este tipo de adaptação é designado de remodelação metabólica: as células de GBM sofrem uma alteração de mecanismos energéticos, com o principal objetivo de conferir vantagens proliferativas e de sobrevivência - o denominado Efeito de *Warburg*. Este efeito foi descrito pela primeira vez na década de 1920 por Otto Warburg, que observou que as células tumorais têm a capacidade de alterar o seu metabolismo energético, substituindo a fosforilação oxidativa mitocondrial aeróbica (OXPHOS) pela glicólise aeróbica, ainda que na presença de oxigénio e mitocôndrias funcionais. Esta adaptação de metabolismos em nada se relaciona com a produção de energia, mas sim com as vantagens proliferativas inerentes, dado que a OXPHOS é mais eficiente em termos energéticos (Wolf *et al.*, 2010). Esta justificação é corroborada pelas diferenças entres os saldos energéticos das duas vias metabólicas em causa, dado que na glicólise a produção de ATP seja inferior. O saldo energético na OXPHOS é de 36 moléculas de adenosina trifosfato (ATP) por molécula de glucose; por sua vez, a glicólise aeróbica conta apenas com a produção de 2 moléculas de ATP por molécula de glucose (Heiden *et al.*, 2009; Strickland & Stoll, 2017).

No entanto, a glicólise produz precursores para a síntese de nucleótidos, aminoácidos e ácidos gordos, o que se traduz em vantagens para o desenvolvimento tumoral (Sanli *et al.*, 2014).

1.2.2 Influência da hipoxia no microambiente tumoral

A progressão de GBM está intrinsecamente relacionada com a existência de regiões de hipoxia no microambiente tumoral, devido à sua proliferação descontrolada. Nas referidas condições, em que a pressão parcial de oxigénio é diminuta, o tumor necessita de fornecimento de oxigénio adicional e nutrientes para que possa progredir (Jawhari *et al.*, 2016). As células tumorais de GBM têm a capacidade de secretar fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGF) de forma a promover a formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes – neovascularização (Brey & McIntire, 2008; Jawhari *et al.*, 2016). Este mecanismo envolve a própria angiogénese, processo que leva à formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes (Brey & McIntire, 2008) e caracteriza-se pelas suas imperfeições vasculares, uma vez que os capilares formados não possuem organização e são disfuncionais (Jawhari *et al.*, 2016). No entanto, e devido à imperfeição geral típica da neovascularização, a hipoxia é acentuada, dando origem a células tumorais com carácter mais agressivo, além de permitir a formação de metástases noutras partes do organismo e, conseqüentemente, a disseminação do tumor (Jawhari *et al.*, 2016).

1.2.3 Homeostase energética: importância da AMPK

A cinase de proteína ativada por adenosina monofosfato (AMPK) é um complexo heterotrimérico de cinase de serina/treonina (Faubert *et al.*, 2014). É a principal reguladora da homeostase energética, tendo influência no crescimento e proliferação celular, na síntese proteica e de ácidos gordos (Valtorta *et al.*, 2017). A sua atividade tem como função a proteção celular, nomeadamente em casos de stress fisiológico e patológico, onde se incluem cenários como privação nutricional, hipoxia, exercício e choque térmico, derivado de alterações na homeostase energética (Sanli *et al.*, 2014). Esta enzima possui três subunidades, sendo uma catalítica (subunidade α) e duas reguladoras (subunidades β e γ), funcionando como um “sensor energético” que identifica variações nas quantidades de ATP. A sua ativação pode ter duas origens: por ligação do AMP à subunidade reguladora γ ; ou por fosforilação, catalisada pela cinase de

proteína do fígado B1 (LKB1). Quando há um aumento do rácio AMP (adenosina monofostato)/ATP, resultante de uma diminuição dos níveis de energia, a AMPK é ativada e induz alterações no metabolismo energético através da troca de processos anabólicos (gasto energético) por processos catabólicos (produção de energia) (Chhipa *et al.*, 2018; Faubert *et al.*, 2014; Kim & You, 2017; Strickland & Stoll, 2017; Valtorta *et al.*, 2017).

A ativação da AMPK tem como finalidade a conservação de energia de forma a impedir uma catástrofe energética que culmine em morte celular (Faubert *et al.*, 2014). Um dos processos que vê a sua atividade alterada é o ciclo celular, cuja paragem é induzida por ação da AMPK, até que os níveis de ATP sejam repostos (Strickland & Stoll, 2017).

O conhecido e mais utilizado inibidor da ação da AMPK é o composto C (cC) (6-[4-(2-Piperidin-1-ylethoxy) phenyl]-3-pyridin-4-ylpyrazolo [1,5- a]pyrimidine), também designado de dorsomorfinina (Fig. 1) (Liu *et al.*, 2014).

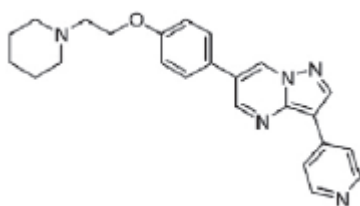


Figura 1- Estrutura química do composto C. (Adaptado de Vogt *et al.*, 2011)

Este composto atua como um potente e reversível inibidor competitivo da AMPK (Ríos *et al.*, 2013), não sendo, no entanto, específico apenas para a AMPK, inibindo outras cinases de proteína (Bain *et al.*, 2007; Vogt *et al.*, 2011). Estudos têm vindo a ser desenvolvidos utilizando o composto C em contexto de GBM. Alguns autores referem que este composto apresenta efeitos citotóxicos em células de GBM, de forma independente da AMPK (Liu *et al.*, 2014; Vucicevic *et al.*, 2011); no entanto, outros autores não observaram tal efeito (Liu *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2019). Apesar disso, e de ser um inibidor não específico da AMPK, o composto C continua a ser o composto usado para estudar a ação da AMPK, bem como outros aspetos como a proliferação, migração e sobrevivência celular (Dasgupta & Seibel, 2018).

1.2.3.1 Ação a nível tumoral

Ao nível das células tumorais, a AMPK apresenta efeitos contraditórios, podendo atuar como supressor ou indutor tumoral, como mostra a Figura 2. Estas ações parecem dependentes quer do estado metabólico das células, quer do nível de ativação da própria AMPK (Strickland & Stoll, 2017).

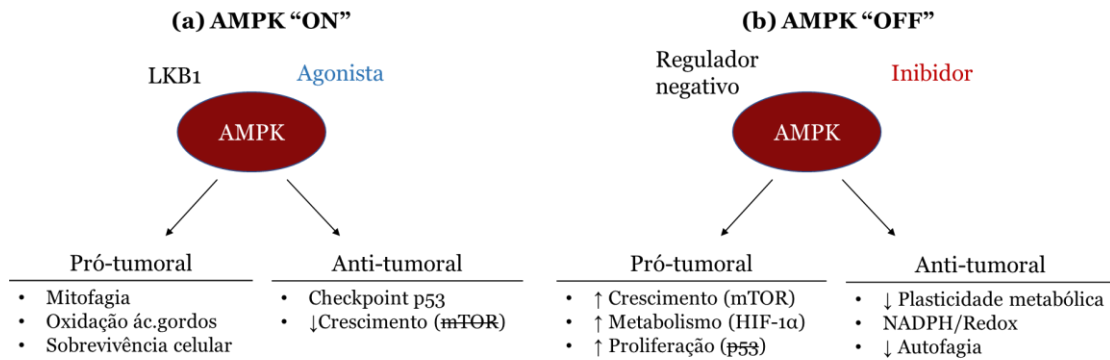


Figura 2- Efeitos pró- e antitumorais da AMPK. Com base no contexto, a ativação e inibição da AMPK pode desencadear efeitos pró- e antitumorais em ambos. **(a)** Na presença de um agonista ou da fosforilação pela LKB1, a AMPK é ativada. Por consequência, é despoletada uma ação antitumoral por ativação de vias metabólicas alternativas como a oxidação de ácidos gordos e a mitofagia, que promovem a sobrevivência celular em condições de stress. Por outro lado, é desencadeada uma resposta antitumoral através da inibição da proteína alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR), pelo que o crescimento tumoral diminui. O ciclo celular é interrompido por ação da proteína p53. **(b)** Através de um inibidor da AMPK, também pode ser despoletada uma resposta pró- e antitumoral. A inibição da ação da AMPK leva à ativação da mTOR, que promove o crescimento tumoral. A via glicolítica é estimulada via fatores de transcrição induzíveis por hipoxia, neste caso o HIF-1α. O ciclo celular prossegue sem interrupção por parte do p53. Contrariamente, numa visão antitumoral, perde-se a plasticidade metabólica característica da ação da AMPK, repercutindo-se a nível da homeostase energética, ROS e autofagia (Adaptado de Faubert *et al.*, 2014).

Em casos de GBM, estando a AMPK ativa, são descritos efeitos de supressão tumoral por ação da proteína antitumoral p53 e pela inibição proteína alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR). A mTOR é uma cinase de proteína serina/treonina, responsável pelo controlo do crescimento, proliferação e sobrevivência celular. A sua função é exercida tendo em conta fatores como os níveis energéticos, nutricionais e fatores de crescimento, através da regulação da síntese proteica, lipídica, motilidade celular, transcrição e autofagia. É um efetor da AMPK, encontrando-se inibida quando a AMPK é ativada após detetar um aumento do rácio AMP/ATP. (Mazurek *et al.*, 2020; Strickland & Stoll, 2017). Nos efeitos descritos de supressão tumoral aquando da ativação da AMPK, inclui-se a promoção da apoptose, melhor prognóstico e resposta à quimioterapia, observando-se melhorias ao nível antitumoral quando os níveis de glicose diminuem. No entanto, nestas mesmas condições de depleção glicolítica, também se observam efeitos pró-tumorais, como a capacidade de promover a migração e sobrevivência tumoral,

inibição da apoptose, estimulação da autofagia por inibição da mTOR e manutenção dos níveis de NADPH (forma reduzida do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) (Faubert *et al.*, 2014; Strickland & Stoll, 2017; Thirupathi & Chang, 2019).

A estimulação da AMPK leva ao aumento da expressão dos transportadores de glicose 1 e 3 (GLUT1 e GLUT3) nas membranas celulares, situação semelhante ao que acontece na presença de fatores de transcrição induzíveis por hipoxia (HIFs). Os HIFs vêm a sua atividade aumentada em condições de stress induzido por hipoxia (Labak *et al.*, 2016), desencadeando a cascata de eventos que leva ao Efeito de *Warburg*, induzindo a reprogramação da OXPHOS para a glicólise aeróbia (Yuen *et al.*, 2016). A sua ação desencadeia efeitos a nível celular, entre os quais: aumentam a expressão dos GLUT1 e GLUT3; regulam positivamente a ação de enzimas da via glicolítica nas diversas etapas, como a hexocinase 2 (HK2), a cinase do piruvato (PK) e a isoforma A da desidrogenase do lactato (LDHA); regulam negativamente a ação da enzima desidrogenase do piruvato (PDH); ativam vias metabólicas alternativas (via das pentose fosfato) (Bryukhovetskiy *et al.*, 2018; Duan *et al.*, 2018; Strickland & Stoll, 2017; Yuen *et al.*, 2016). Todas estas ações têm como finalidade a manutenção da via da glicólise aeróbica. Adicionalmente, os HIFs têm ainda capacidade de modulação/estabilização da energia celular e prevenção da apoptose por ação da HK2, de forma a promover condições favoráveis ao desenvolvimento do tumor (Bryukhovetskiy *et al.*, 2018).

Por consequência e intermédio da ação dos HIFs, é promovido o Efeito de *Warburg* e a via glicolítica, de forma a estimular a progressão tumoral (Faubert *et al.*, 2014). Por outro lado, a AMPK pode ser classificada como reguladora do Efeito de *Warburg*, uma vez que quando se encontra ativa, inibe a via glicolítica, promovendo a troca de metabolismo energético para a OXPHOS. Por outro lado, quando a AMPK está inibida, verifica-se que há promoção do Efeito de *Warburg* e, desta forma, estimulação da via glicolítica (Sanli *et al.*, 2014).

Num estudo desenvolvido por El-Masry *et al.* (2015), os autores estudaram a relação entre as vias de sinalização 3-cinase do fosfatidilinositol/cinase B de proteína/ proteína alvo da rapamicina nos mamíferos (PI3K/Akt/mTOR) e LKB1/AMPK, de forma a compreender qual a relação existente entre estas em contexto tumoral. O estudo foi realizado em linhas celulares de cancro da mama, utilizando um agonista da AMPK, AICAR. Os resultados obtidos permitiram inferir acerca da possibilidade um *crosstalk* entre as vias de sinalização em estudo, mas que tal interação depende da genética celular, dado que os resultados obtidos não foram concordantes entre as várias linhas celulares estudadas (El-Masry *et al.*, 2015).

A AMPK, além de inibir a ação da mTOR, influencia também a atividade apoptótica celular (Yang *et al.*, 2011). A proteína linfoma de células B extra grande (Bcl-XL) é uma proteína antiapoptótica transmembranar existente na mitocôndria, membro da família Bcl-2, cuja função é regular o processo apoptótico (Li *et al.*, 2019). Num estudo desenvolvido por Yang *et al.* (2011), os autores observaram que, em células da linha celular de fígado humano HuH-7, a fosforilação da Bcl-XL pela AMPK inibe a sua ação antiapoptótica, o que permite a libertação da proteína de ligação direta a inibidores de proteínas apoptóticas com baixo ponto isoelétrico (DIABLO) da mitocôndria. A proteína DIABLO reduz a atividade do inibidor de proteínas apoptóticas (IAP), promovendo a ativação de caspases iniciadoras, como a caspase-8, que por sua vez ativa a caspase-3 efetora e desencadeia a apoptose celular (Yang *et al.*, 2011).

1.3 Metformina

Dos vários fármacos existentes capazes de modular o balanço OXPHOS/glicólise, destaca-se a metformina (Met). A Met, 1,1-dimetilbiguanida (Fig. 3), é o fármaco mais usado a nível mundial no tratamento da diabetes tipo 2 (He & Wondisford, 2015; Valtorta *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). Sintetizado pela primeira vez na década de 1920, este biguanídeo ganhou notoriedade quando se constatou o seu efeito como agente anti-hiperglicémico (He & Wondisford, 2015; Kim & You, 2017). Em pacientes diabéticos, a dosagem administrada é de cerca de 500-2500 mg por dia (Sesen *et al.*, 2015). Parte dos efeitos deste fármaco são mediados pela ativação indireta da AMPK (Mazurek *et al.*, 2020).

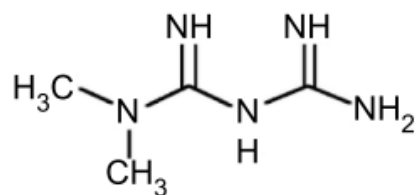


Figura 3 - Estrutura química da metformina (Adaptado de Saraei *et al.*, 2019).

Mais recentemente, foi também referida uma ação antitumoral da Met em GBM. A sua administração é maioritariamente por via oral, na forma de sal clorohidratado, que lhe permite tornar-se mais hidrofílica e, conseqüentemente, solúvel em água. Em conjunto com a sua carga positiva a pH fisiológico, requer a presença de transportadores

catiônicos orgânicos (OCT) para que a Met seja capaz de entrar nas células e exercer a sua função (He & Wondisford, 2015; Kim & You, 2017; Kinaan *et al.*, 2015; Mazurek *et al.*, 2020; Sesen *et al.*, 2015). No entanto, possui uma cadeia hidrocarbonada apolar, que lhe confere propriedades lipofílicas e capacidade de ligação aos domínios lipídicos das membranas celulares (Łabuzek *et al.*, 2010; Mazurek *et al.*, 2020). A sua hidrofobicidade permite-lhe atravessar a barreira hematoencefálica com elevada facilidade, sendo este um aspeto de elevada importância tendo em conta a localização do GBM e a ineficácia de outros fármacos associada à incapacidade de atravessar esta estrutura (Łabuzek *et al.*, 2010).

Estudos recentes apontam a Met como um possível tratamento em casos de GBM. A Met já demonstrou efeitos antitumorais, como inibição do crescimento e diminuição da proliferação de células tumorais, efeitos estes demonstrados em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Cancros da mama, cólon, fígado, pâncreas, próstata, endométrio, pulmão, leucemias e melanomas são alguns dos exemplos onde este fármaco já demonstrou algum tipo de efeito antitumoral (Heckman-Stoddard *et al.*, 2017; Mazurek *et al.*, 2020).

1.3.1 Mecanismos de ação antitumoral da Metformina

O mecanismo de ação antitumoral da Met pode seguir duas vias: 1) uma independente de AMPK, ao nível do stress oxidativo mitocondrial; ou 2) através da regulação da atividade da AMPK (via dependente) (Mazurek *et al.*, 2020).

A via independente de AMPK atua ao nível da mitocôndria. Também aqui a Met recorre a OCTs para conseguir atravessar a membrana mitocondrial para entrar neste organelo, onde tem influência na produção de ATP e consumo de oxigénio (Kim & You, 2017; Mazurek *et al.*, 2020). Na mitocôndria, a Met provoca inibição do complexo I da cadeia transportadora de eletrões (ECT1), que induz um efeito em cadeia e leva à diminuição da produção de ATP. Os rácios AMP/ATP e lactato/piruvato aumentam e o potencial membranar mitocondrial é alterado, tendo impacto no aumento do stress oxidativo, bem como na predominância de processos catabólicos (Kim & You, 2017; Mazurek *et al.*, 2020; Sesen *et al.*, 2015). A AMPK atua também ao nível da atividade da dismutase do superóxido (SOD), tendo um efeito inibitório sobre esta. Esta inibição traduz-se em consequências ao nível do stress oxidativo, uma vez que a SOD é responsável pela proteção celular contra as ROS: quando inibida, há um aumento de oxidação e, por consequência, dos níveis de ROS, pois não são destoxificadas e a sua produção está aumentada (Mazurek *et al.*, 2020).

A via dependente de AMPK é ativada quando há um aumento do rácio AMP/ATP, promovendo a troca metabólica para a OXPHOS em consequência da reversão do Efeito de *Warburg*, como resposta da sua ação de “sensor energético” (Faubert *et al.*, 2013; Kim & You, 2017; Mazurek *et al.*, 2020). Esta troca metabólica implica uma interrupção da atividade biossintética, que se repercute na proliferação, migração e sobrevivência celular e, conseqüentemente, leva a uma supressão do desenvolvimento do tumor. A própria via independente de AMPK pode ter efeito na via dependente, uma vez que provoca o aumento do rácio AMP/ATP, que é exatamente o que despoleta a via dependente de AMPK. Há também uma estimulação da autofagia por ativação da AMPK (Mazurek *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2017). A autofagia é uma via de autodegradação celular com bastante importância na regulação da homeostase energética. Embora possa desempenhar um papel protetor celular, participa também na indução da morte celular. Consiste num sistema de autodegradação de componentes celulares com recurso a lisossomas, de forma a manter a homeostase celular em situações de stress. A ativação da AMPK inibe a mTOR, que atua como regulador negativo da autofagia e, desta forma, é capaz de estimular a autofagia, promovendo a reciclagem celular (Onorati *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2012).

A Met influencia também os níveis de insulina e do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), atuando de forma indireta nos seus recetores, IR e IGF-1R, respetivamente, devido à sua função de agente anti-hiperglicémico. Esta ação tem consequências nas vias de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK (ou MAPK, via de sinalização de cinases de proteína ativadas por mitogénios) e PI3K/Akt/mTORC1, sendo ambas inibidas por ação da Met, pelo que a sobrevivência e síntese proteica nas células tumorais se encontram suprimidas (Wang *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2014).

A Figura 4 representa de forma esquemática os vários mecanismos antitumorais descritos, que o tratamento com Met induz.

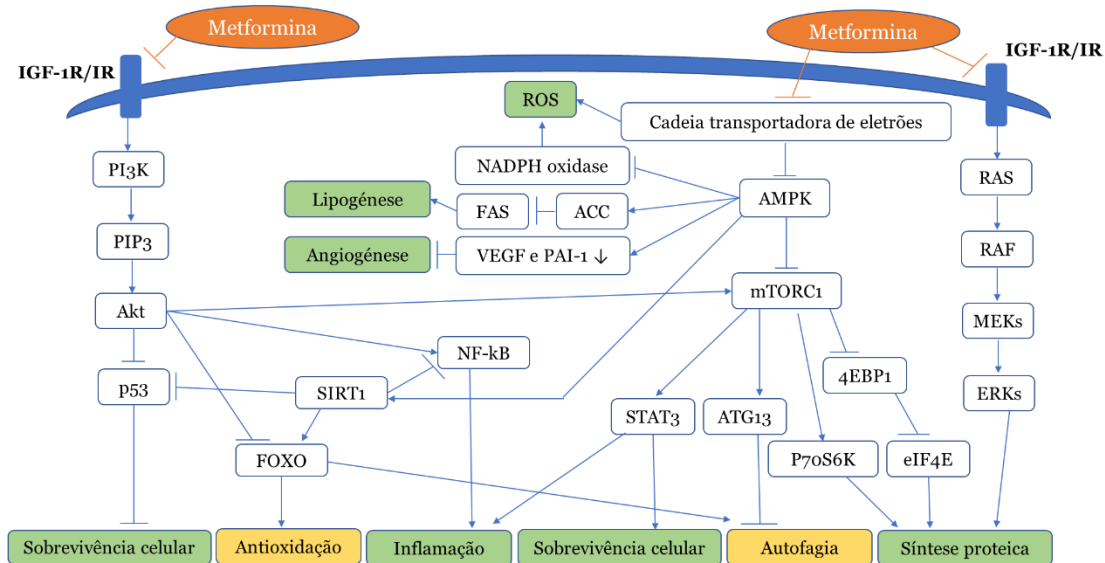


Figura 4 - Alvos intracelulares da ação da metformina. A amarelo encontram-se os passos que a Met ativa após tratamento; a verde estão representados os mecanismos celulares inibidos por ação desta. A Met, através da via independente da AMPK, bloqueia a cadeia transportadora de elétrons, provocando um aumento do rácio AMP/ATP e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O bloqueio referido exercido pela Met possibilita a ativação da AMPK que, através da inibição do complexo 1 da mTOR (mTORC1), desencadeia ações através de intermediários celulares que culminam na inibição de processos inflamatórios, sobrevivência celular e síntese proteica, com estimulação da autofagia, promovendo uma abordagem anti-tumoral. A Met exerce efeito ao nível dos receptores IGF-1R e IR, inibindo a via metabólica 3-cinase do fosfatidilinositol (PI3K)/3,4,5 – trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3)/ cinase B de proteína (Akt), libertando a proteína antitumoral p53, que trava a sobrevivência tumoral e inibindo o mTORC1. A ação inibitória da Met nos mesmos receptores tem ainda consequências ao nível da via metabólica MAPK (via Ras/Raf/MEK/ERK), que sendo inibida, entre outras funções, trava a síntese proteica (Adaptado de Wang *et al.*, 2017).

1.3.2 Ação da metformina: estudos em GBM

A Met é um fármaco seguro para pacientes com diabetes tipo 2, conferindo ainda proteção acrescida ao nível do controlo da obesidade e doenças cardiovasculares (Mazurek *et al.*, 2020). Os seus efeitos secundários são residuais; contudo, quando ocorrem, expressam-se sob a forma de sintomas gastrointestinais e acidose láctica (Wang *et al.*, 2017). Por outro lado, estudos classificam a Met como citotóxica para células de GBM, uma vez que as células apresentam uma viabilidade reduzida após tratamento, observação corroborada por Hassan *et al.*, (2018) em ensaios de viabilidade celular.

Num outro estudo, desenvolvido por Xiong *et al.* (2019), foi avaliado o efeito da Met na atividade da AMPK. Os resultados obtidos mostraram que a Met também exerce efeito antitumoral ao nível da via AMPK/mTOR, uma vez que os níveis de AMPK se mostraram elevados após tratamento com Met, ao contrário dos níveis de expressão da mTOR, que

diminuíram. Consequentemente, houve uma inibição da proliferação tumoral, bem como um aumento da apoptose das células de glioma em estudo.

Os resultados obtidos por Xiong *et al.*, (2019) foram corroborados por um estudo desenvolvido por Sesen *et al.*, (2015). Neste estudo, os investigadores focaram-se nas propriedades antitumorais da Met em células de GBM. Os autores observaram que a Met afeta a função mitocondrial, provocando um aumento da via glicolítica com consequente aumento da produção de lactato. Esta ação tem como consequência a acidificação do meio que acaba por ser tóxico para as células, bem como o aumento do consumo de glicose, desencadeando uma situação de depleção glicolítica. Ao nível proliferativo, observou-se uma diminuição resultante da paragem do ciclo celular, com posterior morte celular. Também o processo autofágico é induzido em células de GBM após tratamento com Met. Em relação ao seu mecanismo de ação, constatou-se que pode seguir por uma via dependente ou independente da AMPK. No mesmo estudo, foi avaliada a eficácia da ação da Met *in vivo*. Nesta análise, comprovaram-se os efeitos antineoplásicos do fármaco, uma vez que houve inibição do crescimento tumoral (Sesen *et al.*, 2015).

Num outro ensaio, realizado por Valtorta *et al.* (2017), os autores observaram que os efeitos *in vitro* da Met são transientes e dependem da linha celular em causa.

Encontram-se também documentados ensaios clínicos realizados em pacientes com GBM para testar a eficácia do tratamento com Met e posterior avaliação da taxa de sobrevivência em comparação com pacientes não tratados (Adeberg *et al.*, 2015; Seliger *et al.*, 2019; Seliger *et al.*, 2020). Os resultados obtidos foram contraditórios: Adeberg *et al.* (2015) mostrou que existe uma correlação entre o tratamento com Met e o aumento da sobrevivência dos pacientes com GBM do tipo primário tratados com o fármaco. Por outro lado, em ambos os estudos desenvolvidos por Seliger *et al.* (2019, 2020), apenas se observou aumento da sobrevivência em pacientes com gliomas de grau III e não em pacientes com GBM. Tais conclusões, apesar de contraditórias, em conjunto com dados obtidos em estudos *in vitro*, possibilitam uma relação benéfica no sentido antitumoral e enaltecem o potencial da Met como possível aplicação terapêutica em GBM.

1.4 Adenosina

Como referido anteriormente, a progressão e proliferação descontrolada de GBM promove a existência de regiões de hipoxia no microambiente tumoral, o que provoca a

acumulação de adenosina (Ado) em resposta ao stress celular gerado pela condição de hipoxia (Jawhari *et al.*, 2016; Marcelino *et al.*, 2020).

A Ado (Fig. 5) é um ribonucleósido endógeno, formado pela ligação de uma molécula de adenina a uma ribose, através de uma ligação β -N⁹-glicosídica (Valdés *et al.*, 2018).

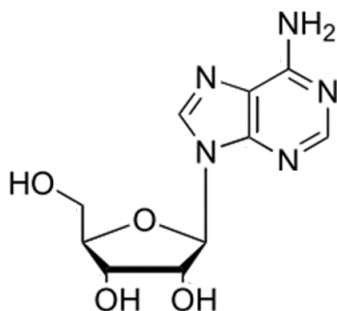


Figura 5 - Estrutura química da adenosina. (Adaptado de Valdés *et al.*, 2018).

A Ado é um substrato da síntese de ácidos nucleicos, atuando também como precursor de outros 5'-fosfato de nucleósidos, como a adenosina monofosfato, difosfato e trifosfato (AMP, ADP e ATP, respetivamente) (Alarcón *et al.*, 2019). A Ado pode ser gerada intracelular ou extracelularmente, desempenhando funções de regulação tecidual a nível local, nomeadamente em condições de depleção energética (Borea *et al.*, 2015), atuando em condições fisiológicas e patológicas (Valdés *et al.*, 2018). Desta forma, o processo de formação de Ado intracelular é desencadeado com o aumento da atividade metabólica, durante a qual o rácio AMP/ATP aumenta (Siegel *et al.*, 2006), como resposta a condições de stress e danos celulares, observando-se um aumento de concentração em situações de hipoxia e inflamação, atingindo concentrações na ordem dos micromolar (Marcelino *et al.*, 2021). Um ligeiro aumento do rácio AMP/ATP tem repercussões acentuadas na taxa de formação de Ado, uma vez que, em condições fisiológicas, a concentração de ATP é cerca de 50 vezes superior à concentração de AMP. Desta forma, uma ligeira diminuição na concentração de ATP causa um aumento acentuado da concentração de AMP, e, por consequência, da Ado (Siegel *et al.*, 2006).

A Ado não é considerada como sendo um neurotransmissor clássico, uma vez que, ao contrário do que sucede com o ATP, não é armazenada em vesículas sinápticas (Borea *et al.*, 2015; Ceruti & Abbracchio, 2020; Siegel *et al.*, 2006). É, portanto, considerada um neuromodulador (Ceruti & Abbracchio, 2020; Siegel *et al.*, 2006), dada a sua capacidade

de regular a neurotransmissão (Marcelino *et al.*, 2020; Siegel *et al.*, 2006), facilitando-a ou inibindo-a (Siegel *et al.*, 2006).

Este ribonucleósido desempenha funções protetoras no decorrer de várias patologias, devido aos seus efeitos a nível neuronal, cardíaco, antinocicetivo (diminuição da percepção e transmissão de estímulos que provocam dor), vasodilatador e pró-angiogénicos (Boison & Yegutkin, 2019). Uma das suas ações centra-se na regulação do suprimento de oxigénio. A sua capacidade de dilatação vascular permite aumentar o fornecimento de oxigénio às células; em contrapartida, é capaz de reduzir as necessidades de consumo de oxigénio dada a sua aptidão para diminuir a utilização de energia celular (Siegel *et al.*, 2006). No que concerne ao sistema nervoso (SN), a sua ação reguladora manifesta-se através da diminuição da libertação de neurotransmissores e da transmissão sináptica, protege de danos neurotóxicos e é capaz de modular a plasticidade sináptica (Marcelino *et al.*, 2020; Siegel *et al.*, 2006).

A Ado extracelular desempenha ainda funções de mensageiro intercelular, uma vez que informa acerca da atividade metabólica da célula, devido à sua relação de proporcionalidade inversa com o ATP. Esta informação é, então, reconhecida por recetores da própria célula ou presentes em células adjacentes – recetores purinérgicos (Siegel *et al.*, 2006).

1.4.1 Metabolismo e origem da adenosina

A formação de Ado ocorre no espaço extracelular através da degradação de ATP em AMP por ação de ectoenzimas, nomeadamente da apirase (CD39) e da 5'-nucleotidase (CD73). A apirase, também conhecida por EctoATP difosfohidrolase ou por ADPase, é uma enzima que se encontra ligada à membrana plasmática e é responsável pela hidrólise sucessiva de ATP extracelular em ADP e de ADP em AMP (Borea *et al.*, 2015; Siegel *et al.*, 2006). Esta é a principal forma de obtenção de Ado extracelular ao nível sináptico (Alarcón *et al.*, 2019; Siegel *et al.*, 2006). Por sua vez, a 5'-nucleotidase hidrolisa o AMP extracelular que, pela perda do grupo fosfato, forma Ado (Alarcón *et al.*, 2019; Borea *et al.*, 2015; Siegel *et al.*, 2006). O seu transporte para o interior das células é mediado por ação de proteínas membranares transportadoras de nucleósidos (ENT 1 e 2), que realizam este processo por difusão facilitada em ambos os sentidos através da membrana celular (Alarcón *et al.*, 2019; Siegel *et al.*, 2006). Os ENT são os transportadores de nucleósidos mais abundantes no cérebro, apresentando uma elevada expressão em neurónios e células da glia (Alarcón *et al.*, 2019).

Em situação de repouso, a Ado extracelular é eliminada maioritariamente por recaptação para o interior da célula por ação dos ENT 1 e 2, onde é fosforilada de novo a AMP por ação da enzima cinase de adenosina (ADK). No entanto, quando as concentrações de Ado intra e extracelulares se encontram elevadas, a Ado sofre uma reação de hidrólise catalisada pela desaminase da adenosina (ADA), formando inosina. Esta torna-se a principal via de metabolização da Ado quando as suas concentrações se encontram elevadas, uma vez que a atividade enzimática máxima da ADA é superior à da ADK. A inosina, produto da desaminação da Ado, é posteriormente convertida em hipoxantina pela enzima fosforilase de nucleósidos. Esta, por sua vez, sofre uma dupla oxidação por ação da enzima oxidase da xantina (XO) a xantina e, de seguida, a ácido úrico, sendo este último eliminado na urina. Pode ainda haver formação de AMP por “reciclagem” da hipoxantina. Por ação da transferase do fosforibosil da hipoxantina-guanina (HGPRT), a hipoxantina é convertida em monofosfato de inosina (IMP) e, posteriormente, a AMP por inserção de um grupo amina (Siegel *et al.*, 2006). Desta forma, a regulação da concentração de Ado extracelular é feita através do equilíbrio entre a atividade dos transportadores ENT e a atividade e expressão das enzimas responsáveis pela sua metabolização (Alarcón *et al.*, 2019).

Todavia, a formação de Ado também pode ocorrer a nível intracelular através de dois mecanismos: 1) por hidrólise do AMP intracelular, mediado pela 5'-nucleotidase; ou 2) pela conversão de S-adenosil-homocisteína (SAH) em Ado e homocisteína, reação esta catalisada pela enzima hidrolase da S-adenosil-homocisteína (SAHH) (Marcelino *et al.*, 2020; Siegel *et al.*, 2006).

A Figura 6 representa esquematicamente o metabolismo da Ado descrito anteriormente.

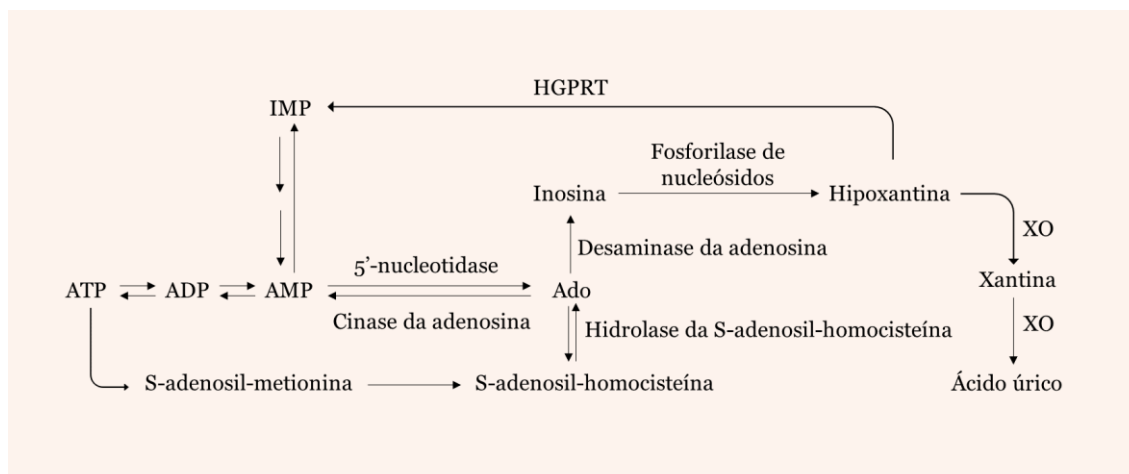


Figura 6 - Metabolismo da adenosina. Esquema representativo dos mecanismos de formação e degradação da Ado intracelular (Adaptado de Siegel *et al.*, 2006).

1.4.2 Efeitos da adenosina no sistema nervoso e relação com GBM

Mesmo em condições fisiológicas, o cérebro apresenta elevadas concentrações de Ado (Sai *et al.*, 2006). No entanto, em situação de hipoxia típicas do microambiente tumoral, as suas concentrações elevam-se ainda mais, derivado da depleção energética, podendo atingir concentrações na ordem dos micromolar (Marcelino *et al.*, 2020). Este aumento é agravado pela inibição da enzima ADK mediada pela condição de hipoxia (via HIF-1 α , subunidade 1 α de HIF), o que impede a conversão da Ado em AMP e, conseqüentemente, a concentração de Ado permanece elevada (Boison & Yegutkin, 2019; Borea *et al.*, 2015). Este fator adquire um papel de protetor neuronal em quadros de isquemia, uma vez que facilita a reposição dos níveis de ATP e da neurotransmissão aquando da reperfusão tecidual de oxigénio e glucose (Sai *et al.*, 2006). No entanto, uma ativação prolongada pode desencadear um efeito de excitotoxicidade neuronal, favorecendo o desenvolvimento tumoral (Borea *et al.*, 2015) e desempenhando um papel de promotor da sobrevivência do tumor (Ceruti & Abbracchio, 2020). Desta forma, é importante ter em conta a capacidade que o tumor possui de expressar diferentes tipos de recetores, dados os efeitos opostos de sobrevivência e morte tumoral que a Ado desempenha aquando da sua ligação a diferentes recetores (Antonioli *et al.*, 2014).

Num estudo desenvolvido por Sai *et al.* (2006), numa linha celular de astrocitoma de rato, observou-se que a aplicação de Ado (1 mM) nestas células induziu uma resposta apoptótica através de vias extra e intracelulares. Por sinalização mediada pela ativação do recetor A₁, uma vez que este recetor está acoplado a proteínas G_i, a ciclase do adenililo é inibida e os níveis de cAMP diminuem, verificando-se a indução da apoptose (Sai *et al.*,

2006). A cinase A de proteína (PKA) é responsável pela inibição da apoptose através da fosforilação da caspase-9, de forma a prevenir a ativação desta caspase iniciadora. Ao diminuírem os níveis de cAMP, a PKA não é ativada, logo não fosforila a caspase-9. Desta forma, a caspase-9, como não se encontra fosforilada, ativa a caspase-3 efetora, promovendo a ativação da via apoptótica (Serrano & Hardy, 2018).

Num outro estudo efetuado em AH por Marcelino *et al.* (2020), observou-se a inibição da proliferação deste tipo de células através de concentrações crescente de Ado e sem que esta fosse mediada por ativação de recetores, comprovado através do uso de antagonistas dos recetores de Ado. Os autores também observaram que o efeito inibitório da Ado é: 1) potenciado por ação da homocisteína e; 2) atenuado por ação de dadores de grupos metilo, como o folato e S-adenosilmetionina (SAM). Desta forma, foi descrito o efeito antiproliferativo da Ado através da reversão do efeito catalisado pela SAH hidrolase (SAHH), tendo sido proposto um mecanismo que descreve o efeito inibitório induzido pela Ado na proliferação de astrócitos humanos (Fig.7). Da combinação de Ado com homocisteína, por inversão da reação catalisada pela SAH hidrolase, há produção de S-adenosil-homocisteína (SAH), cuja acumulação leva à inibição das metiltransferases dependentes de SAM. Como consequência da atividade diminuta destas enzimas, não há doação de grupos metilo necessários para a proliferação astrocitária, pelo que esta é inibida (Marcelino *et al.*, 2020).

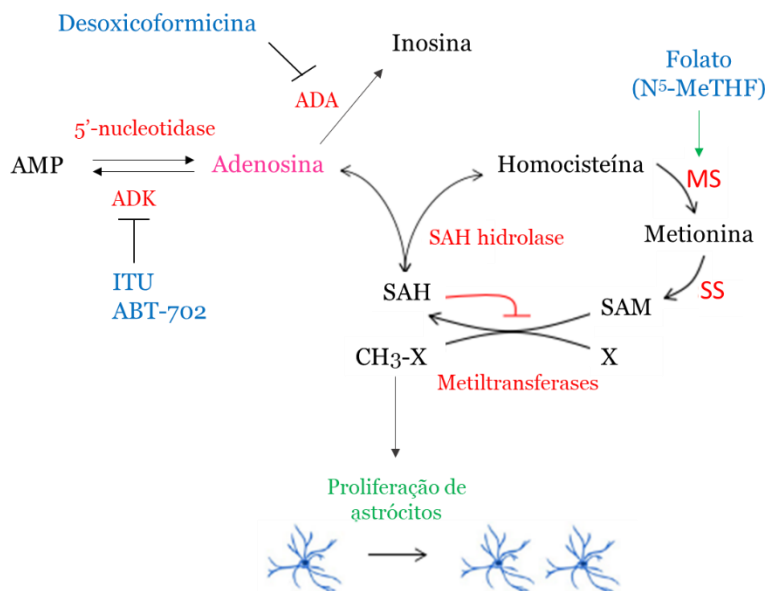


Figura 7 - Mecanismo proposto para a inibição da proliferação astrocitária induzida pela adenosina, independente de recetores. (Adaptado de Marcelino *et al.*, 2020).

A concentração de Ado aumenta devido ao uso de inibidores da ADK, como a 5-iodotubercidina (ITU) e o 4-amino-5-(3-bromofenil)-7-(6-morfolinopiridin-3-il)pirido[2, 3-d]pirimidina (ABT-702) (Marcelino *et al.*, 2020).

No entanto, apesar dos efeitos descritos em astrocitoma de rato (Sai *et al.*, 2006), astrócitos humanos (Marcelino *et al.*, 2020), entre outros, ainda existem poucas informações sobre o efeito da Ado em GBM humano. Num estudo desenvolvido por Marcelino *et al.* (2021), foi avaliado o efeito que o aumento dos níveis de Ado exerce em linhas celulares de GBM (U87, U373 e SNB19) em comparação com astrócitos humanos (HA) normais. Observou-se que o aumento da Ado intracelular, conseguida através da inibição da ADK por ação do seu inibidor ABT-702, induz o efeito inibitório da Ado na proliferação/viabilidade celular em células de GBM e HA. Por outro lado, a adição de Ado exógena diminuiu a proliferação celular em HA, mas não em linhas de GBM. Esta observação sugere que a atividade da ADK está aumentada no GBM comparativamente aos HA, prevenindo assim o efeito inibitório da Ado exógena por fosforilação desta a AMP, o que provavelmente constituirá um mecanismo adaptativo do GBM face aos níveis elevados de Ado no microambiente tumoral.

Uma das maiores dificuldades do uso da Ado em contexto de terapêutica tumoral é a sua rápida taxa de metabolização, derivada do curto tempo de semi-vida como intermediário metabólico, que provoca variações bruscas da sua concentração (Boison & Yegutkin, 2019).

1.4.3 ADK e ABT-702

A cinase de adenosina (ADK) é uma fosfotransferase, sendo a enzima responsável por fosforilar a Ado para formar AMP (Boison, 2013). Esta enzima possui duas isoformas: a citoplasmática (ADK-S), responsável pela reação $\text{Ado} \rightarrow \text{AMP}$ em condições fisiológicas; e a nuclear (ADK-L), cuja ação está relacionada com a via de transmetilação por regulação do sentido da reação catalisada pela hidrolase da SAH e metilação de histonas e DNA (Boison & Yegutkin, 2019). A inibição da ADK provoca o aumento das concentrações de Ado. Assim, a Ado é então capaz de induzir hipometilação do DNA, através da inibição de reações de transmetilação (Marcelino *et al.*, 2020). Um aumento da atividade da ADK repercute-se num aumento da metilação global do DNA, evidenciando o papel da Ado como modulador epigenético (Boison & Yegutkin, 2019). Este é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e

GBM, acentuando as suas propriedades de modulador epigenético (Marcelino *et al.*, 2020).

Um dos conhecidos inibidores da ADK é o 4-amino-5-(3-bromofenil)-7-(6-morfolinopiridin-3-il) pirido[2, 3-d]pirimidina (ABT-702, Fig.8) (Boison, 2013; Marcelino *et al.*, 2020). A sua ação inibitória sobre a ADK impede a conversão da Ado em AMP, mantendo os seus níveis elevados (Boison, 2013).

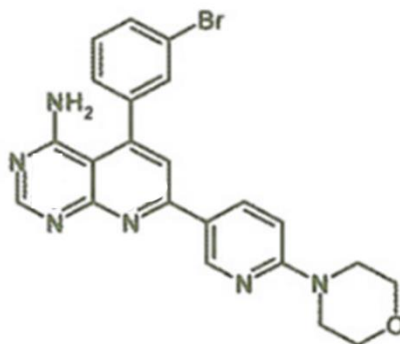


Figura 8 - Estrutura química do ABT-702 (Adaptado de Boison, 2013).

O uso de inibidores de ADK, como o ABT-702, ou a administração exógena de Ado possibilita uma abordagem antitumoral para aplicação no tratamento de GBM. Ao promover o aumento dos níveis de Ado, é esperado que, tal como documentado por Marcelino *et al.* (2020, 2021) em HA, os níveis de SAH aumentem por ação da SAHH, inibindo as metiltransferases de fornecer grupos metilo através da sua ação e, conseqüentemente, diminua a proliferação tumoral de GBM. Dada a informação documentada relativamente ao uso da Met em GBM e o seu potencial anti-tumoral, associar o tratamento de Met com o aumento dos níveis de Ado poderá levar a um aumento do efeito total anti-GBM.

1.5 Linhas celulares de glioblastoma

Na maioria dos estudos *in vitro* para avaliar possíveis tratamentos com aplicação em contexto tumoral de GBM, são utilizadas linhas celulares imortalizadas de glioblastoma, nomeadamente as linhas celulares U87-MG e U373-MG. Estas são linhas celulares correspondentes à forma primária de glioblastoma, sendo que a linha U87 é do tipo neuronal, enquanto que a U373 é do tipo mesenquimal (Motaln *et al.*, 2015). A designação U87-MG corresponde a uma linha celular humana imortalizada de

glioblastoma, aderente, oriunda do cérebro de um indivíduo de sexo feminino de 54 anos, com morfologia *in vitro* de características epiteliais. Por outro lado, a designação U373-MG corresponde a uma linha celular humana imortalizada de glioblastoma, aderente, oriunda do cérebro de um indivíduo do sexo masculino de 50 anos, com morfologia *in vitro* de características astrocíticas (Masters & Palsson, 2002).

Capítulo 2

2 Objetivo do Trabalho

A Met é um fármaco utilizado como terapêutica para a diabetes tipo 2, mas que tem demonstrado efeitos antitumorais em diversos estudos efetuados em linhas celulares de GBM humano (Sesen *et al.*, 2015; Valtorta *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2019). Por outro lado, a eficácia da Ado nesta área ainda está pouco documentada; no entanto, evidências têm vindo a indicar uma possível aplicação terapêutica em GBM, tendo em conta dados obtidos noutros estudos (ver Marcelino *et al.*, 2020; Sai *et al.*, 2006). Porém, o efeito da aplicação combinada de Met e Ado em GBM ainda não foi investigada, tendo sido objetivo de estudo no presente trabalho.

O objetivo principal do presente estudo consistiu em avaliar a capacidade antiproliferativa e citotóxica da Met em GBM, quer de forma isolada, quer quando os níveis de Ado foram aumentados por aplicação de Ado exógena ou por inibição da metabolização desta, utilizando um inibidor da ADK. O contributo da AMPK no efeito antiproliferativo da Met foi também avaliado.

Deste modo, de forma a comparar o efeito dos fármacos em células tumorais e em células normais, os estudos em causa foram desenvolvidos em linhas celulares de GBM (U87 e U373) e astrócitos humanos (AH).

Capítulo 3

3 Material e Métodos

3.1 Células

De forma a executar os objetivos definidos para o presente trabalho, foram utilizadas linhas celulares de GBM, U87-MG e U373-MG, gentilmente cedidos pelo Dr. Joseph Costello (Universidade da Califórnia, São Francisco). Os astrócitos humanos (AH) foram adquiridos na ScienCell.

3.2 Cultivo celular e incubação com fármacos

3.2.1 Expansão e contagem de células

As células em estudo foram criopreservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, tendo apenas sido descongeladas no momento necessário, em banho, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As células foram acondicionadas em tubos de criopreservação, contendo cada tubo 500 mil ou 1 milhão de células. De forma a garantir a sua sobrevivência e prevenir a formação de cristais resultantes do processo de congelamento, as células foram colocadas em meio de criopreservação, num volume total de 1 mL/tubo. A composição do meio de criopreservação encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1- Composição do meio de criopreservação das diferentes células em estudo.

LINHAS CELULARES (U87 e U373)	ASTRÓCITOS HUMANOS (HA)
Meio DMEM completo	Meio de astrócitos completo
DMSO 10%	
FBS 40%	

Ambas os tipos celulares, linhas de GBM e HA, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² e/ou de 75 cm², tendo sido colocadas a crescer numa incubadora de CO₂ (NuAire DHD AutoFlow 5510 Air Jacketed CO₂ Incubator). As condições de incubação foram de 37 °C, em atmosfera humidificada com 5 % de CO₂ e 95 % de ar atmosférico, até se atingir cerca de 70 a 80 % de confluência celular.

O cultivo das linhas celulares U87 e U373 foi realizado em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose* (Biowest), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) (Merck) e 0.1 % de gentamicina (Sigma-Aldrich). Quando atingida a confluência celular pretendida de 70-80 %, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) (Sigma-Aldrich), previamente aquecido a 37 °C. Procedeu-se à tripsinização das células aderentes com solução de tripsina (Sigma-Aldrich) diluída em DPBS (1:2), com incubação durante alguns minutos, de forma a permitir que as células se soltem da superfície à qual aderiram. A reação da tripsina foi parada com igual volume de meio de cultura completo.

O procedimento para a cultura de AH foi semelhante. No entanto, foi necessário realizar um revestimento prévio da superfície de crescimento celular com poli-L-lisina (ScienCell) sofrendo incubação com esta pelo menos durante 24h. A solução de poli-lisina (10 mg/mL) foi preparada tendo sido diluída numa proporção de 15 µL de poli-lisina para cada 10 mL de água estéril. Os AH foram cultivados em Meio de Astrócitos, utilizando o kit comercial: 500 mL de meio suplementado com 10 mL de FBS, 5 mL de Suplemento de Crescimento de Astrócitos (AGS) e 5 mL de solução de antibiótico penicilina/streptomicina (P/S). À semelhança das linhas, quando atingida uma confluência celular de AH de 70-80 %, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com DPBS. O procedimento de tripsinização para AH também foi semelhante, tendo sido utilizado um volume adequado de solução de tripsina/EDTA 0.25 % e igual volume de *Trypsin Neutralization Solution* (TNS) para parar a reação, após alguns minutos de incubação com a solução de tripsina/EDTA.

A suspensão celular obtida no passo de tripsinização, quer de linhas celulares, quer de HA, foi transferida para um tubo e centrifugada durante 5 minutos, a 1500 rpm (centrífuga Sigma 2-16KL). O *pellet* obtido foi ressuspensão num volume de meio de cultura completo adequado ao tamanho do *pellet*. Num tubo eppendorf, realizou-se uma diluição de 1:2 onde se misturaram-se 10 µL da suspensão celular de interesse e 10 µL de corante azul de tripano (0.4 %) (ScienCell). Procedeu-se à contagem do número de células com recurso a câmara de Neubauer, utilizando a fórmula (1):

$$(1) \text{ N}^{\circ} \text{ células/mL de meio completo} = \text{média dos 4 quadrantes exteriores} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Para realizar os ensaios de viabilidade celular, as células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, com densidades celulares de 1800 células/cm² para a linha U373 e de 6500 células/cm² para a linha U87 e HA. A cultura em placas de 96 poços foi realizada tendo em conta a área dos poços deste tipo de placa: ~0,32 cm² /poço. Em cada poço correspondente, foram colocados 150 µL de suspensão celular.

Para o cultivo de AH em placas de cultura de 96 poços, à semelhança do que foi feito na etapa de expansão, realizou-se um revestimento dos poços, tendo sido adicionada solução de poli-lisina na mesma proporção. A placa foi posteriormente colocada a incubar no mínimo durante 24h (a 37 °C, em atmosfera humidificada com 5 % de CO₂ e 95 % de ar atmosférico). Após incubação, o seu conteúdo foi removido e os poços lavados com 50 µL de água estéril. Após secagem dos poços, foi feita a cultura celular de acordo com a densidade celular pretendida, tendo sido colocados 150 µL de suspensão celular em cada poço correspondente. De forma reduzir a evaporação e a manter a concentração do meio de cultura, foram adicionados 50 µL de DPBS estéril aos intervalos entre poços da placa.

Aquando do cultivo de células de linhas de GBM e AH em placas de 96 poços, foram também incluídas as condições de branco (poços sem células, só com meio de cultura completo) e poços com DPBS, de acordo com o *layout* da placa pretendido para cada ensaio.

3.2.2 Incubação com fármacos

Após a realização da cultura celular, as células foram colocadas a incubar a 37 °C durante 48h. Ao fim de 24h, o meio de cultura foi renovado com igual volume (150 µL). Terminadas as 48h de incubação, foram realizados os estímulos, tendo este momento sido identificado como hora zero (0h). Neste passo, o meio de cultura de todos os poços foi removido: nas condições de controlo (apenas células com meio de cultura), o meio de cultura foi renovado (150 µL), sendo substituído por meio de cultura novo; nas restantes condições em estudo, as células foram incubadas, durante 72h, com 150 µL da solução dos fármacos a testar. Todos os ensaios incluíram poços relativos ao veículo e ensaio de controlo. Ambas as linhas celulares (U373 e U87) e os AH foram submetidas ao mesmo tratamento, nas mesmas condições e com os mesmos tempos de execução.

Foram realizados 5 tipos de estudos, com os respectivos ensaios de viabilidade celular. As soluções stock dos fármacos estudados foram preparadas da seguinte forma: Met foi dissolvida em meio de cultura completo, Ado em água estéril, e ABT-702 e cC em Dimetilsulfóxido (DMSO).

A sequência temporal das várias etapas do procedimento experimental dos estudos realizados foi seguida de acordo com a representação da Fig. 9.

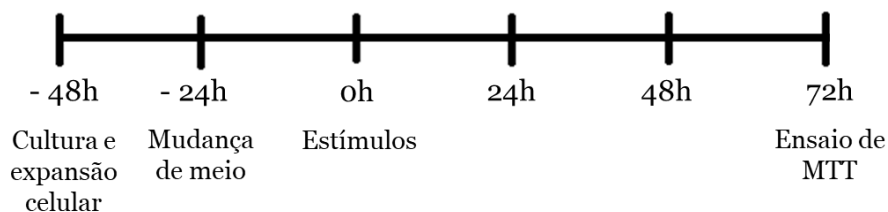


Figura 9 - Representação temporal dos ensaios de MTT.

3.2.2.1 Curva concentração-resposta da Met em linhas de GBM

Para a determinar a curva concentração-resposta da Met em células U373 e U87, foram utilizadas concentrações crescentes de Met clorohidratada (Cayman Chemical Company) para a realização dos estímulos: 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM. O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a representação temporal da Fig. 9.

3.2.2.2 Efeito combinado da Met e Ado/ABT-702 em linhas de GBM

Estudo executado em linhas de GBM, U373 e U87, tendo estas sido incubadas com os fármacos Met (10 e 25 mM), Ado (30 μ M) (Sigma-Aldrich) e ABT-702 (15 μ M) (Tocris), de forma isolada e combinadas entre si (Met + Ado e Met + ABT-702). Neste estudo, foi também incluída a condição de veículo.

Devido à rápida metabolização da Ado (Boison & Yegutkin, 2019), realizaram-se reforços deste composto (1 μ L/poço com condição Ado), de 8 em 8h, com 1 μ L de uma solução intermédia de Ado 4500 μ M. Nos restantes poços, o volume foi compensado com 1 μ L de água estéril.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a representação temporal da Fig. 9.

3.2.2.3 Estudo de compensação do choque osmótico em linhas de GBM

Estudo executado em linhas de GBM, U373 e U87. As células foram incubadas com os fármacos Met (10 e 25 mM) e ABT-702 (15 μ M), de forma individual e combinadas entre si (Met+Ado e Met+ABT-702). Foram ainda incluídas as condições de veículo e veículo com sacarose 50 mM. A todas as condições experimentais, exceto as condições com Met 25 mM, foi também adicionada solução de sacarose 50 mM. O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a representação temporal da Fig. 9.

3.2.2.4 Efeito combinado da Met e ABT-702 em HA

Estudo realizado em HA, tendo as células sido incubadas com Met (10 e 25 mM) e ABT-702 (15 μ M), de forma individual e combinadas entre si (Met+ABT-702). Incluiu-se, também, a condição de veículo no referido estudo. O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a representação temporal da Fig. 9.

3.2.2.5 Estudo da influência do cC no efeito da Met em linhas de GBM

O estudo foi realizado em linhas celulares de GBM, U87 e U373. As células foram incubadas com diferentes concentrações de cC (2,5 e 5 μ M) (Tokyo Chemical Industry) e de Met (10 e 25 mM), de forma isolada e combinadas entre si (Met + cC).

Nos poços com condições “Met + cC”, foram administrados 150 μ L de solução intermédia de cC 100 μ M. Após 30 minutos da administração de cC, procedeu-se à junção da Met na concentração correspondente, utilizando-se a solução stock Met 1 M: nos poços com Met 10mM, adicionaram-se 1,5 μ L; nos poços com Met 25 mM, adicionaram-se 3,75 μ L. O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a representação temporal da Fig. 9.

3.3 Ensaios de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular realizados tiveram como base o procedimento descrito por Kumar *et al.*, 2018, utilizando *Thiazolyl blue tetrazolium bromide* (MTT) ultrapuro (VWR). O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico que permite avaliar a atividade metabólica celular, através de uma reação de redução catalisada pelas redutases mitocondriais. Estas enzimas promovem a redução do composto MTT em formazano pelas células viáveis, composto este de cor arroxeadada, que é posteriormente solubilizado com DMSO. A sua concentração é determinada através da medição da absorvância a 570 nm, permitindo inferir acerca da percentagem de células viáveis existentes, uma vez que a intensidade colorimétrica lhe é diretamente proporcional. A diminuição da intensidade colorimétrica pode estar relacionada com uma diminuição da viabilidade celular ou com uma redução ao nível da proliferação celular (Kumar *et al.*, 2018).

Após 72h do início dos estímulos, o meio de cultura foi substituído (100 µL). Foram adicionados a todos os poços (controlo, veículo e condições experimentais) 10 µL de MTT (5 mg/mL) dissolvido em DPBS. As células foram colocadas a incubar a 37 °C, protegidas da luz, até formar cristais de formazano, garantindo que o tempo de incubação fosse inferior a 4 horas. Após o período de incubação, o conteúdo dos poços foi removido e os cristais de formazano foram dissolvidos em 100 µL de DMSO, com agitação da placa. As absorvâncias foram lidas a 570 nm num espectrofotómetro de placas (Bio-Rad xMark). Realizaram-se duas leituras para cada tipo celular, com células e sem células, para eliminar possíveis interferências. Para a leitura sem células, foram transferidos 80 µL do conteúdo de cada poço para uma outra placa e foi realizada uma nova leitura, no mesmo comprimento de onda.

A análise das absorvâncias obtidas foi realizada em percentagem em relação à condição controlo, de forma a avaliar o efeito dos compostos em estudo na viabilidade celular, dado que a absorvência lida a 570 nm é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis em cada poço. A Fig. 10 ilustra a representação esquemática desta técnica, desde a etapa de cultura celular à leitura da absorvância após o ensaio de MTT.

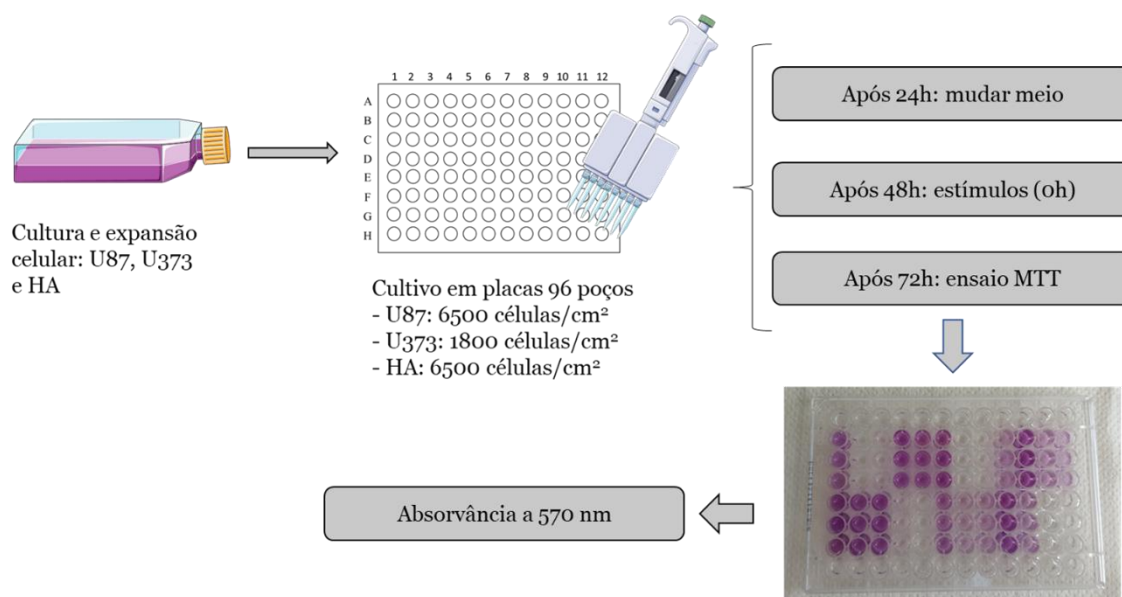


Figura 10 - Representação esquemática do processo experimental, desde a cultura celular à leitura de absorvância.

3.4 Expressão génica

3.4.1 RNA total

3.4.1.1 Extração de RNA

A extração de ácido ribonucleico (RNA) de células de AH e linhas de GBM foi realizada com TRI Reagent (TRI) (Sigma Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram adicionados 300 μL de reagente TRI a cada amostra celular. As células foram lisadas por meio mecânico, manual e recorrendo a vórtex. Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 70 μL de clorofórmio. Foi efetuada uma agitação por 10 a 15 segundos, seguindo-se uma nova incubação à temperatura ambiente, por 10 minutos. A separação por fases foi obtida por centrifugação (Hettich MIKRO 200R) a 4°C, 12000 g e com duração de 15 minutos. Posteriormente, a fase aquosa foi removida para um novo tubo *ependorf*, ao qual se adicionaram 200 μL de isopropanol, de forma a precipitar o RNA. Os tubos foram, então, agitados por inversão e incubados em gelo por 10 minutos, findos os quais foi efetuada uma nova centrifugação a 4 °C, 12000 g, por 10 minutos. Removeu-se o sobrenadante, o *pellet* obtido foi lavado com 1 mL de etanol 75 % em água DEPC (*diethylpyrocarbonate*) e centrifugado a 4 °C, 7500 g, por 5 minutos. O procedimento de lavagem do *pellet* foi repetido, tendo sido realizadas um total de 2 lavagens por *pellet*. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado, o *pellet*

foi seco de forma a remover o excesso de etanol e ressuspendido para rehidratação em volume apropriado de água DEPC, tendo sido armazenado a -80 °C.

3.4.1.2 Integridade e quantificação do RNA total

De forma a avaliar a integridade do RNA total, realizou-se um gel de agarose 1% em tampão TAE 1x, corado com GreenSafe Premium (NZYThec), sendo este último utilizado como marcador de peso molecular de ácidos nucleicos. O GreenSafe é um agente intercalante que emite fluorescência quando se liga a DNA (ácido desoxirribonucleico) ou RNA, a 270 e 290 nm, aproximadamente (picos de excitação secundários), e a 530 nm (pico de excitação principal e mais forte). De forma a facilitar a deposição das amostras de RNA nos poços do gel, homogeneizou-se 2 µL de RNA com 8 µL de *loading buffer* (10x), de forma a aumentar a sua densidade e permitir observar a migração no gel a olho nu. Após migração das amostras, o gel foi exposto e observado com recurso a luz ultravioleta (UV) num transiluminador (UVITEC), de forma a avaliar a integridade do RNA total extraído.

A quantificação do RNA total extraído foi efetuada através da leitura da absorvância num nanoespectrofotómetro (Implen NanoPhotometer), utilizando um volume apropriado de amostra de RNA total. A partir desta análise, determinou-se o rácio da densidade ótica lida a 260 e 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) e a concentração obtida.

3.4.1.3 Tratamento com DNase I

Após a análise da integridade e quantificação, procedeu-se ao tratamento das amostras de RNA com DNase I, de forma a remover possíveis contaminações por DNA genómico.

Em microtubos, foram adicionados 1 µg de amostra de RNA, 1 µL de *reaction buffer* 10x com cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 1 µL de DNase I e água DEPC até perfazer o volume total de 10 µL. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos, num termociclador (Bio-Rad T100 Thermal Cycler). Posteriormente, adicionou-se a cada microtubo 1 µL de EDTA 50 mM e as amostras foram colocadas a incubar a 65 °C durante 10 minutos.

3.4.2 Síntese de cDNA

Para realizar a síntese de cDNA (DNA complementar), recorreu-se à técnica de transcrição reversa de RNA em cDNA, com recurso ao *RevertAid First Strand cDNA*

Synthesis Kit (Thermo Scientific). Foram preparadas em microtubos a *Mix 1* e a *Mix 2*, com volumes correspondentes a n+1 reações. A *Mix 1* continha, para 1 reação, 1 μL de *random hexamer primers* e 1 μL de água *nuclease-free* do próprio *kit*. A *Mix 2*, para 1 reação, foi preparada com 4 μL de *5x reaction buffer*, 1 μL de *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/ μL), 2 μL de 10 mM *dNTP Mix* e 1 μL de *RevertAid M-MuLV RT* (200 U/ μL), obtendo-se um volume final de 20 μL para cada reação. Ambas as *mix* foram homogeneizadas e colocadas em gelo.

As amostras de RNA tratadas com DNase I na etapa anterior foram colocadas em gelo e adicionou-se 2 μL de *Mix 1* a cada microtubo. Estes foram incubados no termociclador a 65 °C durante 5 minutos, findos os quais foram colocados em gelo. Adicionaram-se 8 μL de *Mix 2* a cada microtubo, com posterior incubação a 25 °C por 5 minutos e, de seguida, a 45 °C durante 60 minutos. A reação foi terminada com aquecimento dos microtubos a 70 °C durante 5 minutos. Os microtubos contendo as amostras de cDNA sintetizadas foram colocados a 4 °C quando a etapa de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional foi realizada no próprio dia. Quando tal não ocorreu, as amostras foram armazenadas a -20 °C até serem utilizadas.

3.4.3 PCR convencional

3.4.3.1 Otimização de *primers* para a ciclina D

A ciclina D é um importante ponto de controlo do ciclo celular. Com o objetivo de otimizar os *primers* para o gene em causa, foi realizada uma análise de expressão através de PCR convencional da ciclina D e de um gene de referência, neste caso a β -actina. Os *primers* para cada gene em estudo foram desenhados no programa *Primer-Blast* (NCBI-NIH) e posteriormente sintetizados pela empresa STABVIDA. Foram preparadas duas *mix*, a *Mix A* (ciclina D) e a *Mix B* (β -actina), para n+1 reações, sendo a única diferença entre elas os *primers* utilizados. Cada *Mix* foi preparada com 5 μL de *Speedy NZYTaQ 2x Green Master Mix* (NZYTech), 0.3 μL de *primer forward* 0.25 μM e 0.3 μL de *primer reverse* 0.25 μM , relativos a cada gene em estudo (Tabela 2), e 3.4 μL de água estéril, perfazendo um volume total de 9 μL por reação. Ambas as *mix* foram preparadas em gelo e homogeneizadas. Para cada gene, foram preparados novos microtubos, onde se adicionaram 9 μL da *Mix* correspondente e 1 μL de amostra de cDNA. Para cada um dos *primers*, foi incluído um microtubo de controlo negativo, onde o volume de cDNA foi substituído por igual volume de água estéril. No final, todas as reações de PCR foram homogeneizadas. Os tubos de PCR foram colocados no termociclador, onde sofreram

sucessivos ciclos de aquecimento/arrefecimento. Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 95 °C durante 5 minutos. Seguidamente, foram realizados 40 ciclos onde o DNA sofreu desnaturação a 95 °C durante 5 segundos, findos os quais a temperatura diminuiu para 58 °C durante 10 segundos, temperatura ótima para ligação dos *primers* ao DNA (*annealing*). A temperatura foi de novo aumentada para 72 °C durante 3 segundos, de forma a promover a polimerização pela enzima Taq (extensão). Após os 40 ciclos, foi realizado um último passo de extensão, a 72 °C, durante 10 minutos. Os produtos de PCR obtidos foram posteriormente colocados a 4 °C.

Tabela 2- Sequências dos *primers* utilizados para o gene da ciclina D e da β -actina.

	Sequências dos <i>primers</i> utilizados		Tamanho do fragmento (pares de base – pb)
Ciclina D	<i>Forward</i>	5- GAT GCC AAC CTC CTC AAC GA -3	204
	<i>Reverse</i>	5- GGA AGC GGT CCA GGT AGT TC -3	
B-actina	<i>Forward</i>	5- TTC CTG GGC ATG GAG TCC T -3	211
	<i>Reverse</i>	5- AGG AGG AGC AAT GAT CTT GAT C -3	

3.4.3.2 Avaliação da ampliação por eletroforese

Para avaliar se a ampliação dos genes em estudo foi bem-sucedida e se a temperatura definida para o *annealing* dos *primers* de ciclina D foi a correta, efetuou-se um gel de agarose 2%, com tampão TAE 1x e utilizando GreenSafe. Foi ainda incluído um poço com o marcador molecular NZYDNA Ladder VI (NZYThec). O gel contendo os produtos de PCR foi posteriormente observado, com recurso a luz UV, no transiluminador.

3.4.4 PCR *real-time*: curva de eficiência para a ciclina D

Para elaborar a curva de eficiência para a ciclina D, foi necessário fazer um ensaio de PCR *real-time* (qPCR), utilizando HA. Este ensaio foi realizado em placas de 96 poços, utilizando *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x)* (NZYTech), com recurso a *CFX Connect Real-Time PCR System* (BioRad).

À semelhança do PCR convencional, foram preparadas duas *mix*, a *Mix A* (ciclina D) e a *Mix B* (β -actina), para n+1 reações, sendo novamente a única diferença entre elas os

primers utilizados. Cada *Mix* foi preparada com 5 μL de *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x)*, 0.4 μL de *primer forward* 10 μM e 0.4 μL de *primer reverse* 10 μM , relativos a cada gene em estudo, e 3.2 μL de água estéril, perfazendo um volume total de 9 μL por reação. Ambas as *mix* foram preparadas em gelo e homogeneizadas.

Prepararam-se diluições seriadas (1:2) das amostras de cDNA (1:2, 1:4, 1:8, 1:16), para a realização da reação de qPCR, na qual também se incluiu o controlo negativo para cada *primer* e amostras de cDNA sem diluição. As diluições de cDNA foram preparadas em gelo e homogeneizadas.

Transferiram-se 9 μL de *mix* para os poços correspondentes da placa de PCR, colocada em gelo. Posteriormente, adicionou-se 1 μL de cDNA (diluído ou não) a cada poço correspondente da placa de PCR, com exceção do controlo negativo, onde o volume de cDNA foi substituído por igual volume de água estéril. Terminadas as pipetações, a placa de PCR foi selada com película. As condições de reação foram as seguintes: 95 °C durante 2 minutos para ativação da polimerase, seguidos de 40 ciclos onde as amostras de cDNA sofreram desnaturação a 95 °C durante 5 segundos, com diminuição da temperatura para 58 °C durante 10 segundos, para *annealing* dos *primers* e de novo um aumento para 72°C durante 3 segundos para promover a polimerização pela enzima.

Os resultados obtidos foram analisados e os valores de Ct (*cycle threshold*) calculados a partir de duplicados. Os Ct são os ciclos em que a fluorescência emitida ultrapassa o *threshold*, limiar de fluorescência definido pelo *software*.

Neste procedimento, foram testadas várias temperaturas de *annealing* (58 °C e 60 °C) e diluições seriadas com diferentes fatores de diluição (1:2 e 1:10). No entanto, das várias tentativas executadas, a melhor eficiência foi obtida com 58 °C de temperatura de *annealing* e fator de diluição 2 (1:2).

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do *software* GraphPad Prism (versão 8.0.1). Os dados obtidos foram analisados e expressos como média \pm erro padrão da média (SEM), correspondendo a pelo menos 3 ensaios realizados de forma independente ($n \geq 3$). A análise estatística foi realizada com recurso ao teste *one-way* ANOVA, seguido do teste *post-hoc* de Tukey e/ou de LSD (*Fisher's least significant difference*). Os resultados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando valor de $P < 0,05$.

Capítulo 4

4 Resultados

4.1 Determinação do EC₅₀ para a Metformina

Começou-se por averiguar o efeito da Met na viabilidade celular das duas linhas de GBM em estudo, U87 e U373. Foram realizados ensaios de MTT, analisando várias concentrações deste fármaco (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM e 50 mM). Com os resultados de absorvância obtidos após o ensaio de viabilidade celular, construíram-se os gráficos da Fig. 11. Foram realizadas pelo menos 3 experiências de viabilidade celular para cada tipo de linha celular de GBM em estudo, de forma independente, em dodecaplicados. Os resultados de viabilidade celular de cada condição em estudo foram comparados com viabilidade celular da condição controlo (apenas células e meio de cultura), 100%.

Comparando a resposta das linhas celulares ao tratamento com Met, observou-se uma resposta mais acentuada na diminuição de viabilidade celular na linha U373 (Fig. 11B) em comparação com a linha U87 (Fig. 11A). De facto, a resposta das U373 traduz-se numa maior diminuição da viabilidade celular após incubação com concentrações maiores do fármaco em estudo, tendo-se observado diferenças significativas no parâmetro em estudo a partir da concentração de 5 mM de Met ($71,55 \pm 4,79\%$) e superiores ($P < 0,05$). Comparativamente, na linha U87, apenas com concentrações mais elevadas foi notória uma redução significativa da viabilidade. Neste tipo celular, apenas após tratamento com o dobro da concentração de Met utilizada na linha U373, 10 mM, e superiores, foi possível observar uma resposta significativa e semelhante em termos da diminuição da viabilidade celular ($76,31 \pm 2,89\%$) ($P < 0,05$).

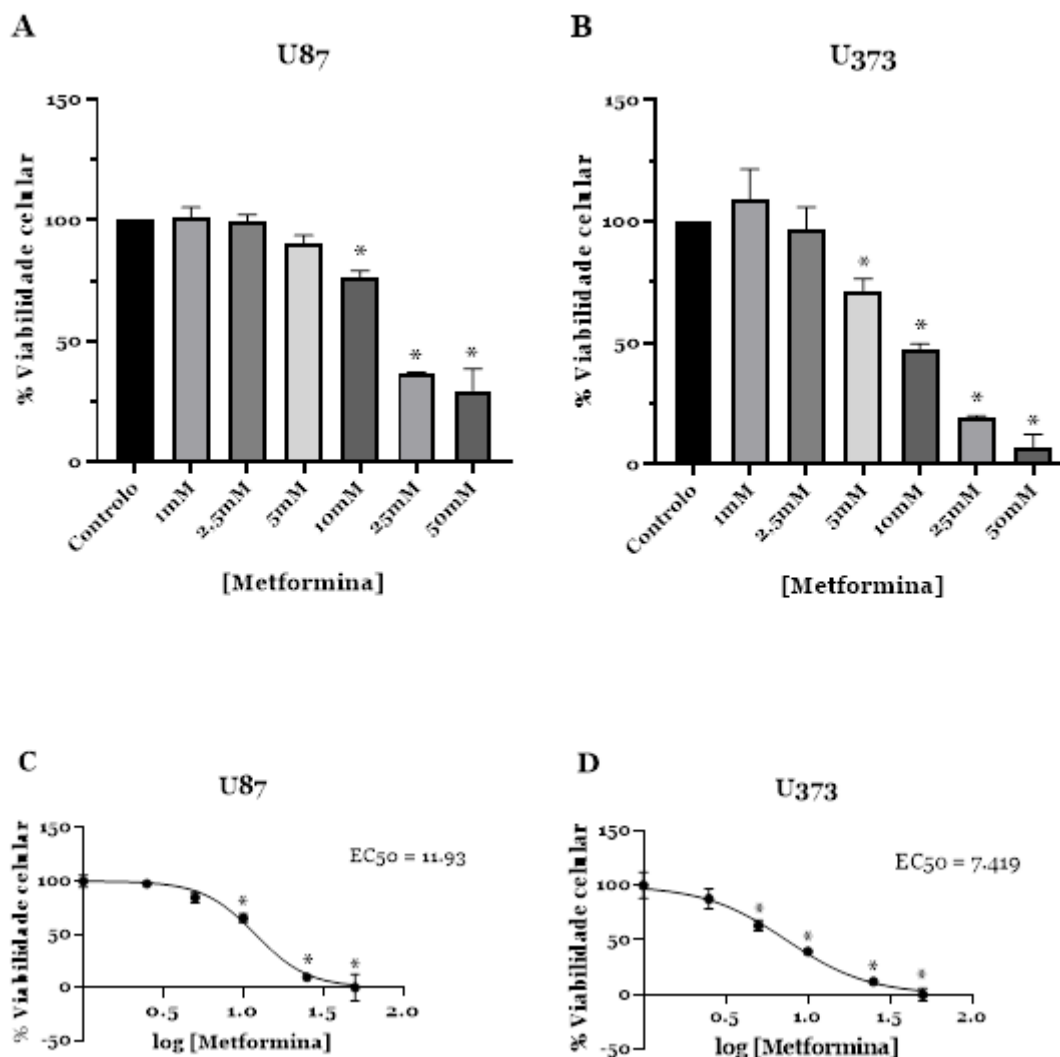


Figura 11 - Estudo de viabilidade celular em linhas de GBM, com diferentes concentrações de Met. A e B representam a análise da viabilidade celular das linhas celulares de GBM em estudo, U87 e U373, respetivamente. C e D representam as curvas concentração-resposta das linhas celulares de GBM, U87 e U373 respetivamente, após tratamento com Met para determinação do EC₅₀. Os resultados apresentados são referentes à média ± SEM de % de viabilidade celular, com n≥3, experiências executadas em dodecaplicados. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste one-way ANOVA, seguido dos testes post-hoc de Tukey e LSD, P<0,05, quando comparado com a condição controlo (100%).

Esta análise possibilitou a determinação da dose necessária para obter 50% da resposta máxima (*half maximal effective concentration*, EC₅₀). Na presente situação, o EC₅₀ corresponde à redução da viabilidade celular para metade após tratamento com Met. A sua determinação foi efetuada através da análise de uma regressão não-linear, para a qual os dados obtidos nos gráficos representados na Fig. 11A e Fig. 11B foram convertidos numa curva do tipo sigmoide, cuja equação permitiu determinar o valor de EC₅₀ para cada tipo de linha celular em estudo. Obtiveram-se valores de EC₅₀=11,93 mM e EC₅₀=7,42 mM para as linhas celulares U87 (Fig. 11C) e U373 (Fig. 11D), respetivamente. Os

valores obtidos nesta análise permitiram determinar quais as concentrações de Met que possibilitariam a obtenção de uma viabilidade celular inferior a 50%, de forma a conseguir limitar o intervalo de dosagem a estudar. Deste modo, optou-se por usar as concentrações de Met 10 e de 25 mM, uma vez que a diminuição da viabilidade celular foi significativa nestes casos ($P < 0,05$). Nestas condições experimentais, foram obtidos valores de viabilidade, após tratamento com as referidas concentrações, de $76,31 \pm 2,89\%$ (Met 10 mM) e $36,39 \pm 0,79\%$ (Met 25mM) para a linha U87, e $47,14 \pm 2,41\%$ (Met 10 mM) e $19,02 \pm 1,00\%$ (Met 25 mM) para a linha U373.

4.2 Estudo do efeito combinado da metformina e adenosina/ABT-702 na viabilidade celular de linhas de glioblastoma

A informação obtida com a análise do EC₅₀ permitiu escolher as concentrações de Met, de forma a estudar o efeito destas na viabilidade celular das linhas U87 e U373, em conjunto com a Ado ou ABT-702. As concentrações de Met selecionadas foram 10 e 25 mM, dado serem as concentrações mais próximas e/ou superiores aos valores obtidos de EC₅₀.

Todas as condições experimentais foram executadas em hexaplicados, tendo sido realizadas pelo menos 3 experiências independentes. Devido à rápida metabolização da Ado (Boison & Yegutkin, 2019), foram realizados reforços deste composto de 8 em 8h, durante as 72h que durou a incubação para a realização do ensaio de MTT, de forma a manter a concentração de Ado nos poços (30 μ M).

Os resultados da análise da viabilidade celular para as linhas U87 e U373, obtidos através da medição dos valores de absorvância, estão representados graficamente na Fig. 12. Através da análise da viabilidade celular da condição “Veículo”, observou-se que o solvente não interferiu com a viabilidade, dado não se ter observado diferença significativa da condição controlo.

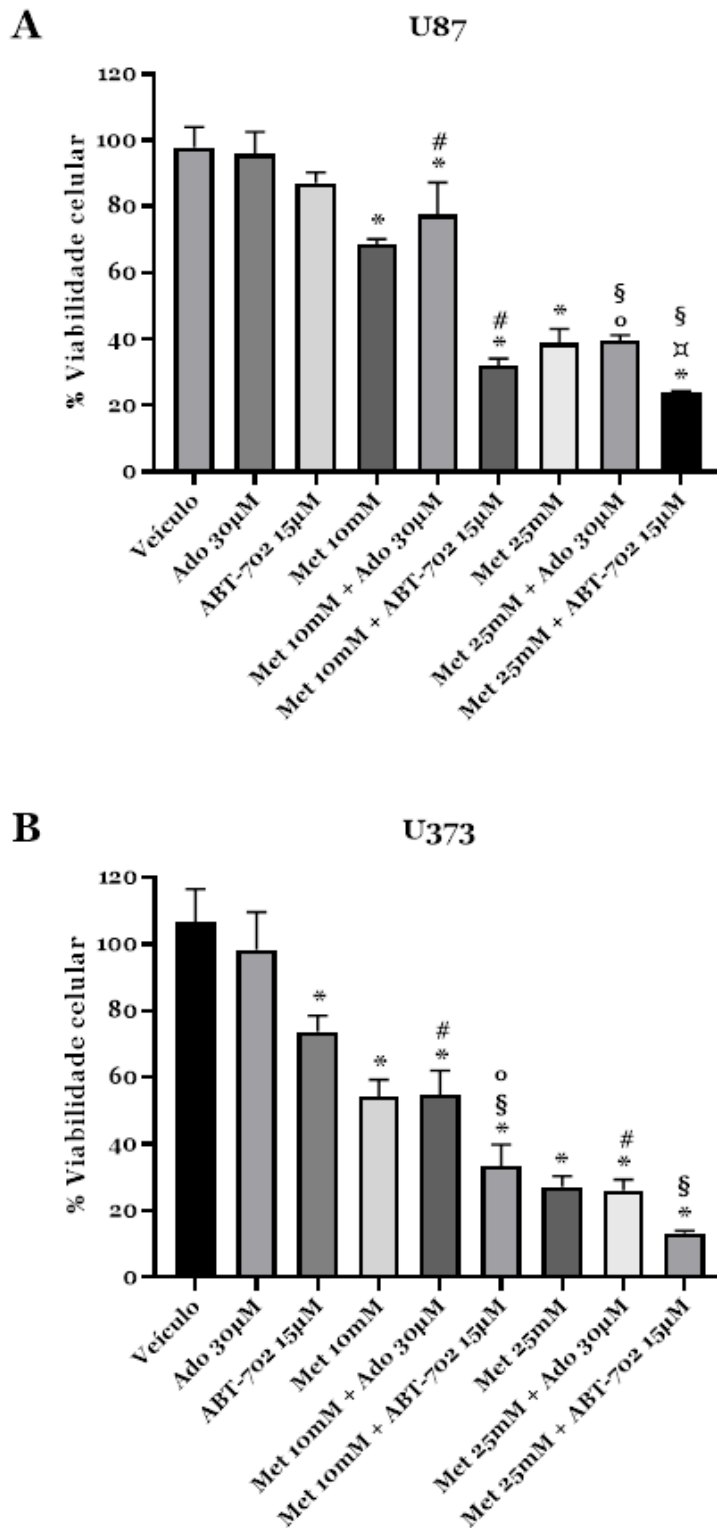


Figura 12 - Estudo de viabilidade celular das linhas de GBM, em percentagem, após tratamento com Met, Ado e ABT-702. A e B referem-se aos ensaios de viabilidade celular realizados nas linhas U87 e U373, respetivamente. Os resultados apresentados são referentes à média \pm SEM de % de viabilidade celular, com $n \geq 3$. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste one-way ANOVA, seguido dos testes post-hoc de Tukey e LSD, $P < 0,05$. *, °, §, #, ¶ referem-se a estatisticamente diferente do veículo, da Met 10 mM sozinha, da Met 25 mM sozinha, da Ado 30 μ M sozinha e do ABT-702 15 μ M sozinha, respetivamente.

Como observado através do gráfico da Fig. 12, a viabilidade celular para ambos os tipos de linhas de GBM em estudo diminuiu após tratamento com Met, nas duas concentrações (10 e 25 mM), como seria de esperar.

O tratamento das células de GBM apenas com Ado 30 μ M teve pouca influência na viabilidade celular, $95,79 \pm 5,84\%$ nas células U87 e $98,34 \pm 9,74\%$ nas U373. Por outro lado, a Ado não alterou o efeito da Met para ambas as concentrações de Met (10 e 25mM).

Todavia, a menor % de viabilidade celular foi atingida para as condições “Met 10 mM + ABT-702 15 μ M” ($32,04 \pm 1,85\%$ nas U87, $33,44 \pm 5,53\%$ nas U373) e “Met 25 mM + ABT-702 15 μ M” ($24,08 \pm 0,25\%$ nas U87, $13,16 \pm 0,76\%$ nas U373). Comparativamente com o tratamento com ambos os compostos de forma isolada (Met e ABT-702), observou-se que a combinação de ambos produziu um efeito cumulativo, dado que a viabilidade diminuiu substancialmente em relação ao efeito isolado de cada um, sendo essa diferença estatisticamente significativa em relação aos dois fármacos sozinhos ($P < 0,05$).

Neste mesmo ensaio, foi possível comprovar que o ABT-702 é mais eficaz do que a administração exógena de Ado, uma vez que o efeito na viabilidade celular, além de semelhante na finalidade, foi superior na intensidade aquando do tratamento com o inibidor da ADK, ABT-702.

4.3 Estudo do efeito combinado de metformina e ABT-702 na comparação da viabilidade celular em astrócitos

Após se ter concluído que o ABT-702 foi mais eficaz do que a administração exógena de Ado na viabilidade celular, a restante análise prosseguiu apenas com ABT-702 15 μ M.

De forma a inferir acerca da influência que os compostos estudados possam exercer em células normais aquando do tratamento de células tumorais em contexto de GBM, procedeu-se à análise da viabilidade celular em AH, submetidos a tratamento com Met e ABT-702, de forma isolada e combinada. Mais uma vez, todas as condições experimentais foram realizadas em hexaplicados, tendo sido executadas pelo menos 3 experiências independentes. Os resultados da análise da viabilidade celular em AH estão representados graficamente na Fig. 13.

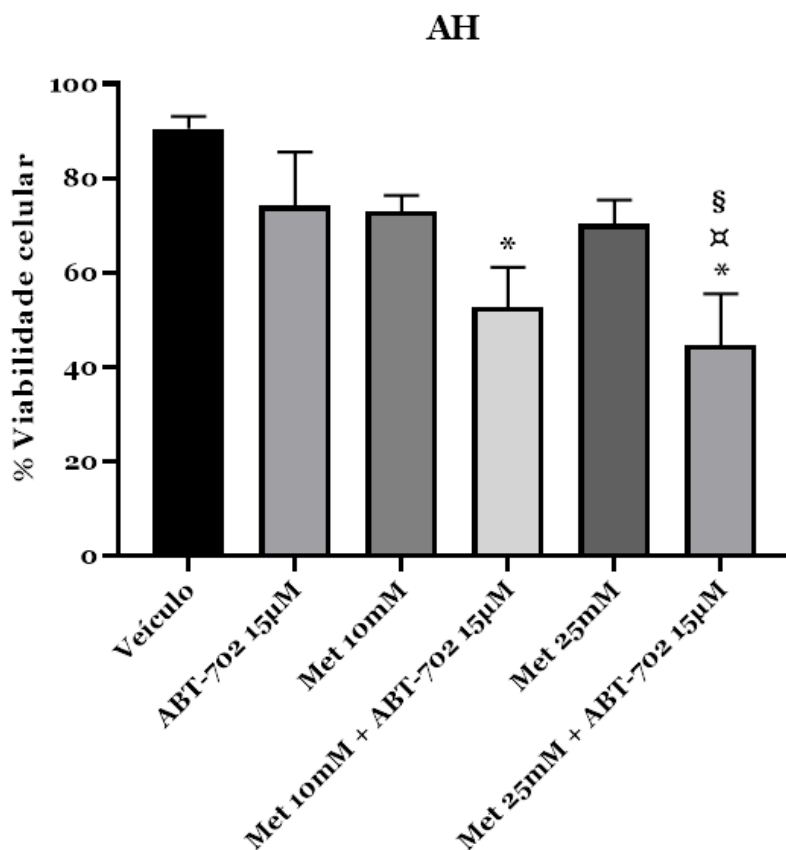


Figura 13 - Estudo de viabilidade celular de AH, em percentagem, após tratamento com Met e ABT-702. Os resultados apresentados são referentes à média \pm SEM de % de viabilidade celular, com $n \geq 3$. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste one-way ANOVA, seguido dos testes post-hoc de Tukey e LSD, $P < 0,05$. *, †, § referem-se a estatisticamente diferente do veículo, da Met 25 mM sozinha e do ABT-702 15 μ M sozinho, respetivamente.

Em comparação com os dados obtidos no ensaio em linhas celulares (Fig. 12), observou-se que, de forma geral, o efeito dos compostos em estudo não afetou de forma tão significativa a viabilidade celular dos AH.

A Met, quando administrada sozinha, não provocou uma diminuição expressiva da viabilidade celular entre as duas concentrações estudadas, ao contrário do que acontecera nas linhas de GBM. Isto é, ambas as concentrações de Met em estudo apresentaram valores muito próximos de viabilidade celular. De facto, foram obtidos valores de viabilidade celular em AH de $73,07 \pm 2,87\%$ quando tratadas com Met 10 mM, e de $70,31 \pm 4,39\%$ quando tratadas com Met 25 mM. Por oposição, o efeito exercido pelo ABT-702 foi semelhante ao observado nas linhas, tendo-se registado uma viabilidade celular de $74,22 \pm 9,82\%$. Apesar de haver uma diminuição da viabilidade celular após tratamento de AH com Met e ABT-702 de forma isolada, os resultados obtidos não apresentaram significância estatística.

Nas condições onde os dois compostos foram usados de forma conjunta, “Met 10 mM + ABT-702 15 μ M” e “Met 25 mM + ABT-702 15 μ M”, observou-se uma diminuição mais acentuada da viabilidade, sugerindo um efeito cumulativo dos dois fármacos, ainda que não atingindo os valores obtidos no estudo com linhas celulares de GBM. Ainda assim, a diminuição da viabilidade foi significativa ($P < 0,05$) em ambos os casos, tendo sido obtidos valores de $52,71 \pm 7,33\%$ e de $44,63 \pm 9,42\%$, para “Met 10 mM + ABT-702 15 μ M” e “Met 25 mM + ABT-702 15 μ M”, respetivamente.

A combinação de Met na concentração mais elevada (25 mM) com o ABT-702 mantém a tendência do estudo com linhas celulares de GBM, ainda que não sendo tão acentuada, sendo a condição experimental que registou menor viabilidade celular. Tal observação poderá ser influenciada pela taxa de proliferação dos AH que, em comparação com as linhas celulares de GBM, é relativamente menor, o que pode ter consequências na diminuição da viabilidade celular. No entanto, o facto de os AH apresentarem um quadro de viabilidade celular mais elevada do que as linhas U87 e U373 é bastante positivo.

4.4 Análise: possibilidade de choque osmótico provocado pela metformina?

Durante o desenrolar do presente trabalho experimental, levantou-se a questão de que o efeito antitumoral da Met observado até aqui com os ensaios de viabilidade celular efetuados pudesse ser influenciado por questões do foro osmótico. Questionou-se se a concentração elevada de Met utilizada provocaria choque osmótico nas células em estudo. Consequentemente, averiguou-se se a diminuição da viabilidade celular poderia ser explicada pela ação de morte celular provocada por choque osmótico. Para inferir acerca deste assunto, foi realizado um outro estudo de viabilidade celular nas linhas de GBM, U87 e U373, onde, para além do veículo normal, se incluiu um veículo compensado com sacarose 50 mM, bem como as condições de controlo, Met (10 e 25 mM) e ABT-702 (15 μ M), de forma isolada e combinada, estudadas até aqui. Foram realizadas pelo menos 3 experiências independentes, com as condições experimentais referidas executadas em hexaplicados.

Como referido, foi incluído uma condição veículo, constituído também por sacarose 50 mM, de forma a compensar as diferenças osmóticas entre as diferentes condições experimentais. Nas restantes condições, exceto aquelas com Met 25 mM, foi também adicionada solução de sacarose 50 mM, de modo a obter uma osmolaridade final de 50

mM em todas as condições experimentais em estudo. A sacarose foi o composto eleito devido ao facto de que as células de GBM, neurónios e AH são incapazes de captar sacarose, nem possuem a enzima necessária para a hidrolisar (invertase), como é o caso do tubo digestivo. A concentração definida foi 50 mM, uma vez que a Met utilizada se encontrava na forma clorohidratada; assim, a concentração de sacarose teria que ser o dobro da concentração máxima de Met utilizada.

Os resultados obtidos no presente estudo encontram-se representados nos gráficos da Fig. 14. Comparando os dois veículos em ambos os tipos celulares em estudo, observou-se que a diferença de viabilidade celular em relação ao veículo normal (sem sacarose) apenas é estatisticamente significativa na linha U87 (Fig. 14A). Os valores de viabilidade para as restantes condições foram concordantes com os resultados obtidos anteriormente, também nas linhas U87 e U373, quando estudado o efeito da Met, Ado e ABT-702 nas referidas células (Fig. 12), pelo que os resultados do presente estudo foram reproduzíveis.

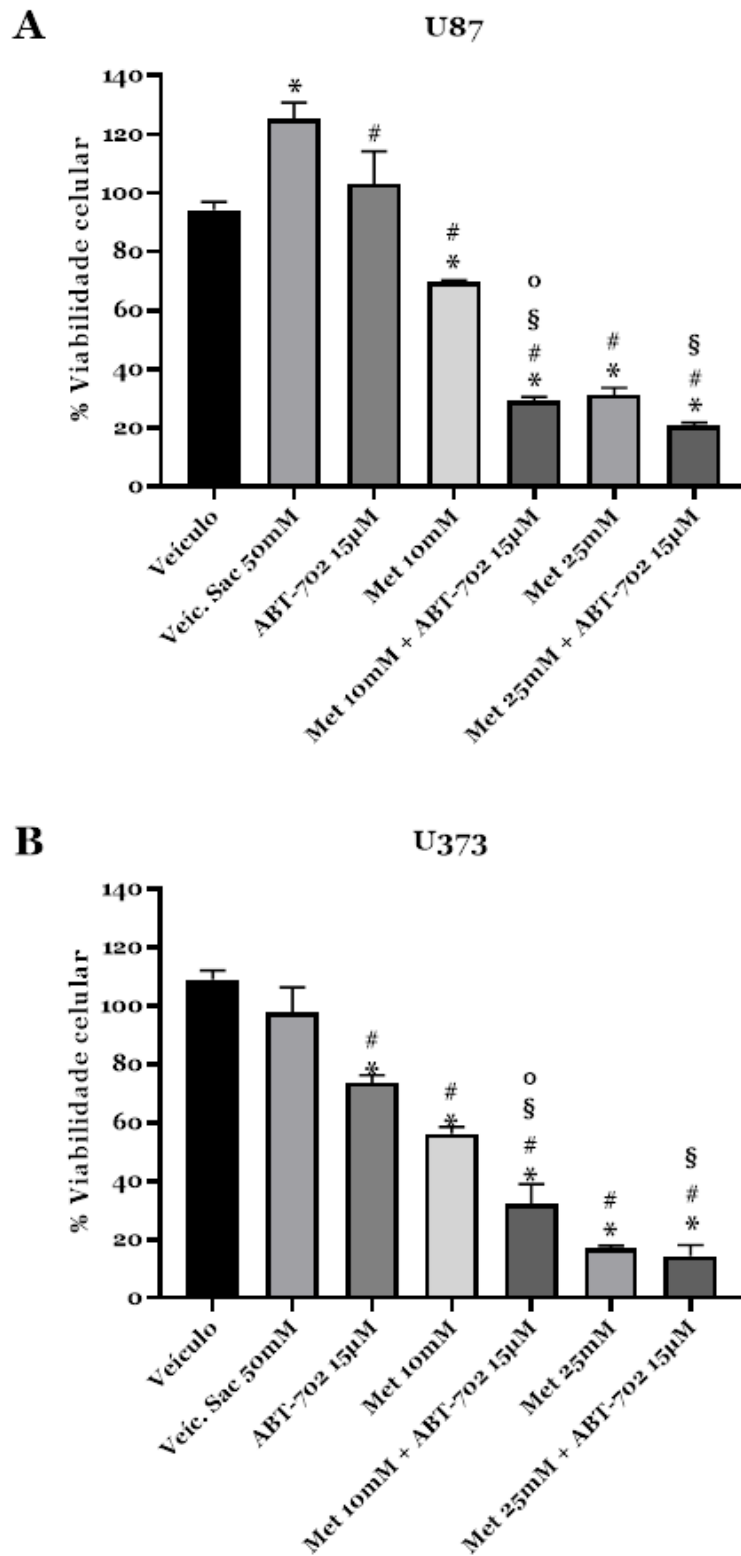


Figura 14 - Estudo de viabilidade celular das linhas de GBM, em percentagem, para determinação de choque osmótico, após tratamento com Met e ABT-702. A e B referem-se aos ensaios de viabilidade celular realizados nas linhas U87 e U373, respectivamente. Os resultados apresentados são referentes à média \pm SEM de % de viabilidade celular, com $n \geq 3$. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste *one-way* ANOVA, seguido dos testes *post-hoc* de *Tukey* e *LSD*, $P < 0,05$. *, #, o, § referem-se a estatisticamente diferente do veículo, do veículo com sacarose 50 mM, da Met 10 mM sozinha e do ABT-702 15 μ M sozinho, respectivamente.

4.5 Mecanismo de ação da metformina: ensaio com composto C

Com o objetivo de estudar qual o mecanismo de ação da Met que poderá estar envolvido na sua ação antitumoral, foi realizado um estudo de viabilidade celular em linhas celulares de GBM, U87 e U373, utilizando o inibidor da AMPK, composto C (cC). As condições experimentais foram realizadas em hexaplicados, tendo sido executadas pelo menos 4 experiências independentes.

A partir do ensaio de MTT e posterior determinação da viabilidade celular, os resultados obtidos foram analisados, nomeadamente as condições de Met e cC, sozinhas ou combinadas. Após tratamento das células em estudo com cC de forma isolada (2,5 e 5 μ M), observou-se uma diminuição geral da viabilidade celular em ambas as linhas. Com esta análise da viabilidade, foi possível construir os gráficos de percentagem de inibição de viabilidade celular exercida pela Met, quer na ausência, quer na presença de cC (Fig.15). Estes gráficos permitem inferir acerca da capacidade que o cC, enquanto inibidor da AMPK, tem em atenuar a ação antitumoral da Met, dado que um dos seus mecanismos de ação é dependente da AMPK.

De forma geral, observou-se um aumento significativo da inibição da viabilidade celular, tanto nas células U87 como nas U373, em relação ao veículo ($P < 0,05$), para ambas as concentrações de Met (10 mM, Fig. 15A e Fig. 15C; 25 mM, Fig. 15B e Fig. 15D), de forma isolada e combinada com cC. Em relação à ação inibitória do cC exercido na ação da Met, na linha celular U87, apenas se observou uma diminuição significativa do efeito inibitório da Met na viabilidade celular na presença da maior concentração de cC (5 μ M), para a maior concentração de Met em estudo, 25 mM (Fig.15B), em comparação com as células tratadas apenas com Met 25 mM ($P < 0,05$). Por outro lado, na linha celular U373, na presença de cC, o efeito da Met na viabilidade celular parece ser mais acentuado, traduzindo-se numa diminuição da inibição. Deste modo, observou-se que o cC possui alguma capacidade para reverter de forma parcial o efeito da Met, pelo menos na linha U87.

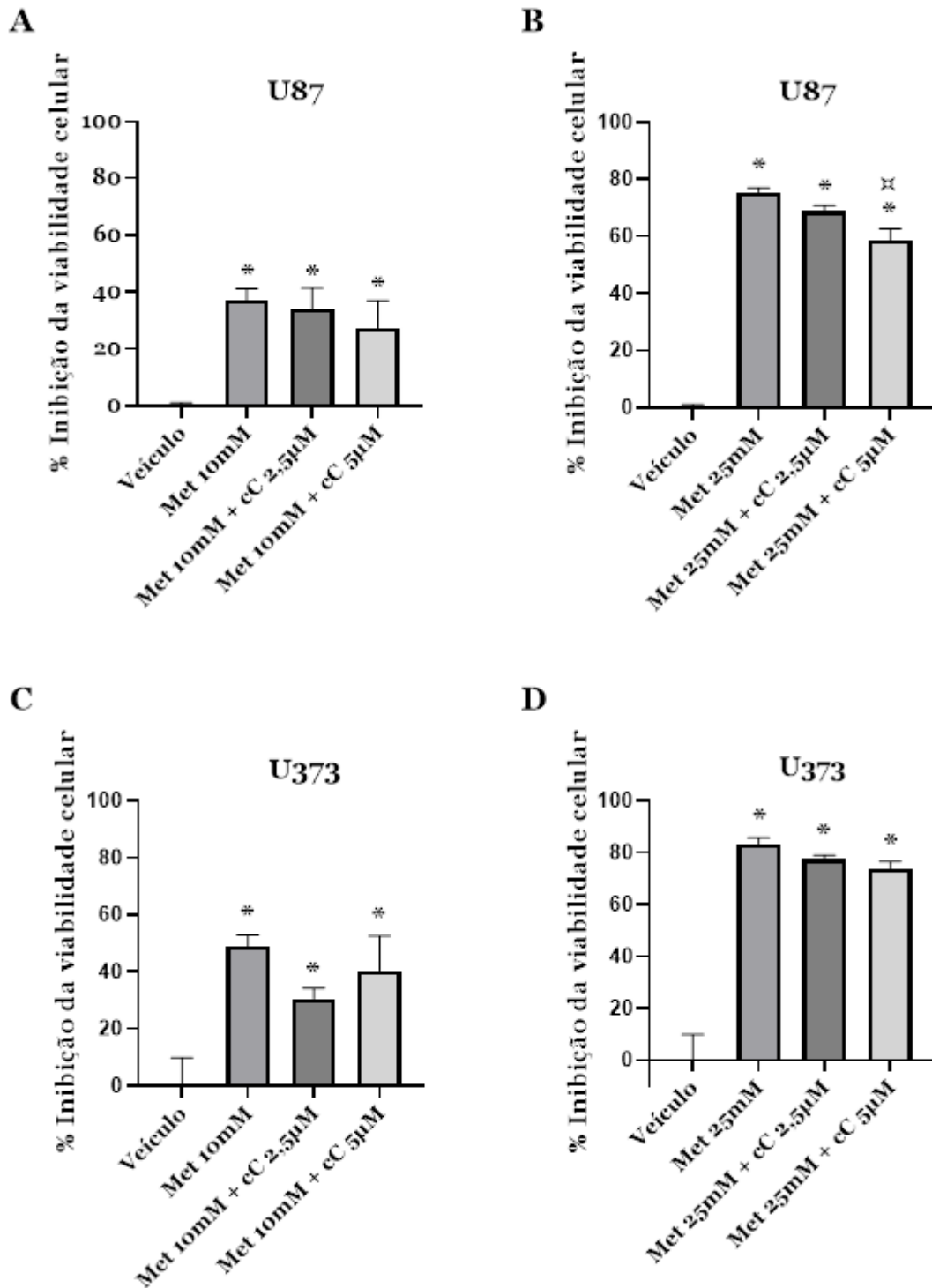


Figura 15 - Percentagem de inibição da viabilidade celular em GBM causada pela Met, na ausência e presença de cC. A e B referem-se aos ensaios realizados com ambas as concentrações de cC e com Met 10 mM e Met 25 mM, respetivamente, na linha U87. C e D referem-se aos ensaios realizados com ambas as concentrações de cC e com Met 10 mM e Met 25 mM, respetivamente, na linha U373. Os resultados apresentados são referentes à média \pm SEM de % de viabilidade celular, comparativamente ao respetivo controlo, com $n \geq 4$. No caso da Met sozinha, o controlo corresponde ao veículo, enquanto que no caso dos ensaios Met+cC, o controlo corresponde ao cC sozinho. A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste one-way ANOVA, seguido dos testes post-hoc de Tukey e LSD, $P < 0,05$. * e ** referem-se a estatisticamente diferente do veículo e da Met 25 mM sozinha, respetivamente.

4.6 Expressão gênica

Tendo-se observado a diminuição da viabilidade celular após tratamento das linhas celulares de GBM com Met, surgiu a dúvida acerca do mecanismo envolvido que causou esta diminuição: será provocada por uma diminuição da proliferação das células tumorais devido a uma paragem do ciclo celular? Ou será devido ao desencadear de fenómenos apoptóticos?

Um dos mecanismos de ação antitumoral da Met é através da ativação da AMPK. Sabe-se que a AMPK, através da sua função como regulador energético, induz a paragem do ciclo celular (Strickland & Stoll, 2017). Como os resultados obtidos no ensaio com cC indicam que o efeito antitumoral da Met possa ser mediado pela ativação da AMPK, ainda que, pelo menos, em parte, decidiu-se proceder ao estudo da expressão gênica da ciclina D. Esta é uma proteína envolvida na regulação da progressão do ciclo celular (Lapenna & Giordano, 2009), pelo que a análise da sua expressão irá informar acerca do estado de ativação do ciclo celular e ainda deduzir qual o possível mecanismo envolvido na ação da Met. Desta forma, caso a ciclina D mantenha os mesmos níveis de expressão após o tratamento com Met, significa que o ciclo celular se encontra ativo e que a diminuição da viabilidade celular em células de GBM não está relacionado com a paragem do ciclo celular, podendo ser colocada a hipótese de ocorrência de fenómenos apoptóticos.

4.6.1 Amplificação dos produtos de PCR para os genes da ciclina D e β -actina

Para efetuar o estudo da expressão gênica da ciclina D, foi necessário proceder-se à otimização dos *primers* para o gene da ciclina D. Desta forma, após se terem testado diferentes temperaturas de *annealing*, verificou-se que a melhor temperatura a utilizar seria 58 °C. Após a realização da reação de PCR, foi efetuada uma eletroforese em gel de agarose e os produtos da reação foram observados e analisados no transiluminador. Observaram-se duas bandas em poços diferentes, como seria esperado, a 204 pb e a 211 pb, correspondendo aos fragmentos do gene da β -actina e ciclina D, respetivamente (Fig. 16).

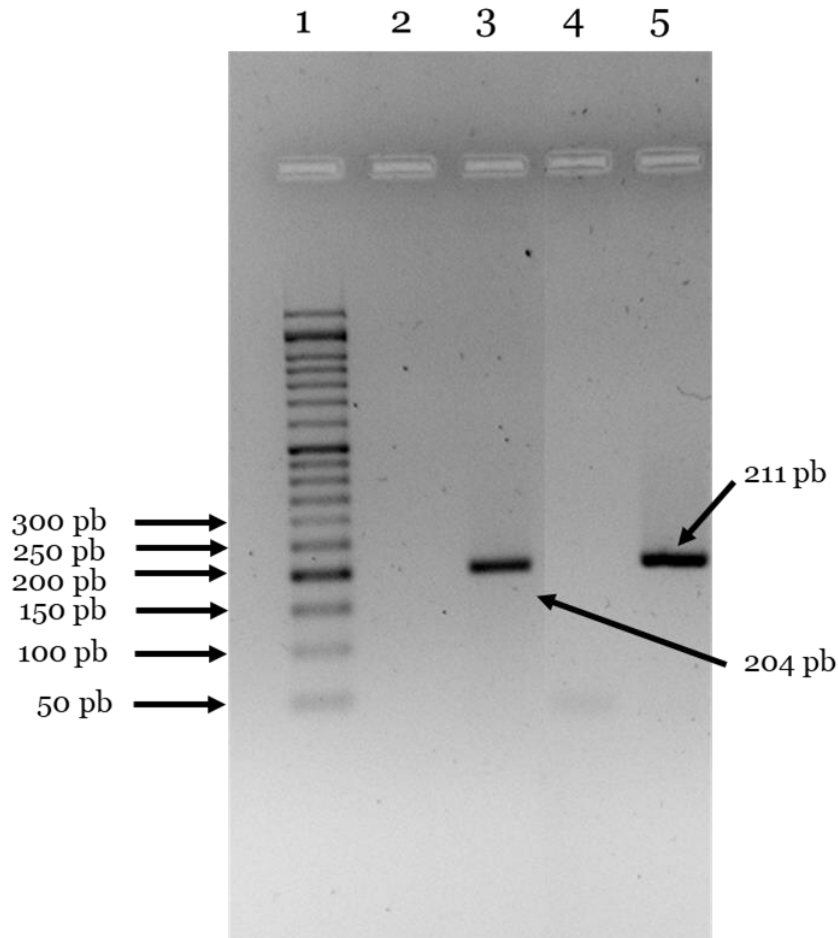


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 2%, dos produtos de PCR dos genes para a ciclina D e β -actina. Da esquerda para a direita estão representados (1) o marcador de pesos molecular, (2) o controle negativo para β -actina, (3) o fragmento correspondente ao gene da β -actina (204 pb), (4) o controle negativo para a ciclina D e (5) o fragmento correspondente ao gene da ciclina D (211 pb).

4.6.2 Curva de eficiência para a ciclina D por PCR *real-time*

Após a otimização dos *primers* para a ciclina D, foi realizado o estudo de eficiência através da técnica de PCR *real-time*. Com os resultados obtidos, através da análise de regressão linear, foi obtido o seguinte gráfico, onde se encontram representados os valores médios de Ct *versus* o logaritmo das concentrações de cDNA (Fig. 17). O cálculo da eficiência foi efetuado através da fórmula (2), tendo-se obtido o valor de 103,59%.

$$(2) \text{ Eficiência (em \%)} = (10^{-1/\text{declive}} - 1) \times 100$$

Curva de eficiência - ciclina D

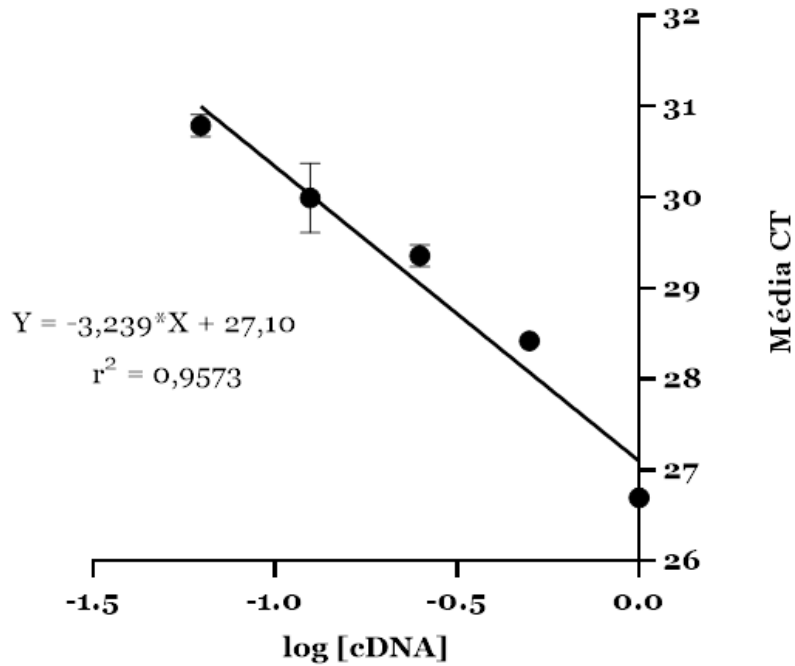


Figura 17- Curva de eficiência obtida para o gene da ciclina D.

Após a esta análise, e tendo-se determinado qual a temperatura ótima para o *annealing* dos *primers* do gene da ciclina D, o passo seguinte será estudar a sua expressão gênica em células de GBM e analisar a expressão após tratamento com Met, de forma a determinar se a diminuição da viabilidade celular observada é ou não provocada por uma paragem do ciclo celular.

Capítulo 5

5 Discussão de resultados

Sendo o GBM a forma mais comum e agressiva de glioma, associada a uma elevada resistência terapêutica, tem sido necessário e crucial encontrar novas estratégias, nomeadamente com fármacos usados para outras patologias, como é o caso da Met. De facto, este é o fármaco mais utilizado a nível mundial para o tratamento da diabetes tipo 2 (Valtorta *et al.*, 2017). Possui características lipofílicas, que lhe permitem atravessar membranas como a barreira hematoencefálica (Łabuzek *et al.*, 2010), bem como capacidade de exercer efeitos antitumorais em diversas situações, nomeadamente para o GBM (Heckman-Stoddard *et al.*, 2017; Mazurek *et al.*, 2020). Sabe-se que a sua ação antitumoral pode ser desenvolvida através de dois mecanismos: via independente de AMPK (ao nível do stress oxidativo mitocondrial) ou via regulação da atividade da AMPK (Mazurek *et al.*, 2020). A AMPK é um importante regulador da homeostase energética, atuando também como reguladora do Efeito de *Warburg* quando ativada (Faubert *et al.*, 2013).

Em condições de hipoxia típicas de GBM, a concentração de Ado aumenta substancialmente, podendo atingir concentrações na ordem dos micromolar (Marcelino *et al.*, 2020), sendo este aumento agravado pela inibição da ADK mediada pelos HIF-1 α (Boison & Yegutkin, 2019; Borea *et al.*, 2015). No entanto, em situações de isquémia, este fator adquire um papel de protetor neuronal (Sai *et al.*, 2006). Estudos têm vindo a ser desenvolvidos, tentando aplicar a Ado como possível estratégia antitumoral em contexto de GBM (Marcelino *et al.*, 2020, 2021; Sai *et al.*, 2006). Contudo, ainda existem poucas informações neste campo.

O ensaio de MTT executado ao longo do presente estudo é um ensaio colorimétrico que permite avaliar a atividade metabólica celular, inferindo acerca da percentagem de células viáveis existentes, uma vez que a intensidade colorimétrica lhe é diretamente proporcional. A diminuição da intensidade colorimétrica pode estar relacionada com uma diminuição da viabilidade celular ou com uma redução ao nível da proliferação celular (Kumar *et al.*, 2018)

Pretendeu-se avaliar a capacidade antitumoral da Met e da Ado, e ainda se a aplicação combinada resultaria num efeito antitumoral cumulativo em GBM. Determinou-se o EC₅₀ da Met com várias concentrações (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM e 50 mM), através do qual se observou que, para ambas as linhas celulares de GBM, a viabilidade

diminuiu com o aumento da concentração de Met, ainda que com eficácias diferentes entre os dois tipos de linhas. Com os resultados obtidos, procedeu-se à determinação do EC₅₀ para cada linha celular, obtendo-se valores de EC₅₀=11,93 mM nas U87, e EC₅₀=7,42 mM nas U373. Este estudo permitiu selecionar as concentrações de Met a utilizar nos estudos subsequentes, tendo-se escolhido as concentrações 10 e 25 mM para ambos as linhas celulares de GBM. Estes resultados foram de encontro às observações feitas por outros autores (Adeberg *et al.*, 2017; Hassan *et al.*, 2018; Sesen *et al.*, 2015; Valtorta *et al.*, 2017) cujos trabalhos desenvolvidos em linhas celulares de GBM utilizando Met demonstraram o seu potencial como agente antitumoral.

No presente estudo, procurou-se avaliar se o aumento da concentração de Ado modificaria o efeito da Met ou se produziria um efeito cumulativo na viabilidade celular quando aplicada conjuntamente com a Met, em GBM. O aumento da concentração de Ado foi produzido por dois processos: 1) administração de Ado de forma exógena, e 2) aumento da concentração de Ado, através do uso do inibidor da ADK, ABT-702. Observou-se que a viabilidade celular em ambas as linhas de GBM foi inferior quando as células foram tratadas com o inibidor ABT-702 15 µM em relação ao tratamento com Ado 30 µM. Esta observação indica que a inibição da degradação da Ado através da ação do inibidor ABT-702 aumenta o efeito da Ado, possivelmente por permitir que os níveis de concentração desta permaneçam mais elevados e constantes face à sua administração exógena, uma vez que a Ado exógena é rapidamente metabolizada pela ADK (Boison & Yegutkin, 2019). Os valores obtidos de viabilidade celular no presente estudo comprovam e são concordantes com o que foi anteriormente observado noutros estudos efetuados pelo nosso grupo de investigação, onde se concluiu que a ação anti-proliferativa do inibidor seletivo da ADK, ABT-702, é mais eficaz que a administração de Ado exógena, em AH (Marcelino *et al.*, 2020), ao passo que a aplicação de Ado exógena não modificou a proliferação celular em linhas de GBM (Marcelino *et al.*, 2021). Porém, o ABT-702 mostrou reduzir a viabilidade celular, quer em AH, quer nas linhas de GBM. Esta observação permite ainda concluir que, provavelmente, o bloqueio da ADK permite um maior aumento dos níveis deste ribonucleósido, em comparação com a aplicação de Ado de forma exógena. A ausência de efeito da Ado exógena nas linhas de GBM, comparativamente aos astrócitos, dever-se-á, provavelmente, ao facto da expressão da ADK estar aumentada em GBM relativamente aos AH (Marcelino *et al.*, 2021).

De facto, como referido no estudo desenvolvido por Boison & Yegutkin (2019), a Ado é rapidamente metabolizada, sendo necessária a realização de reforços de 8h em 8h, de forma a manter a sua concentração elevada. Assim, a inibição da ADK permite contornar o problema, tornando o uso do inibidor ABT-702 uma possível aplicação terapêutica

devido à sua capacidade de aumentar a concentração de Ado, sendo necessária apenas uma aplicação nas condições experimentais descritas anteriormente. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem um efeito inibitório cumulativo da Met e do ABT-702 na viabilidade celular das linhas de GBM estudadas.

O objetivo de todo e qualquer tratamento antitumoral é que os compostos utilizados tenham a mínima repercussão possível nas células normais. No entanto, é muito difícil que uma terapia seja 100% direcionada a um alvo específico. Assim, tentou perceber-se qual a influência do tratamento com Met e ABT-702 nas células normais, neste caso, em AH. Realizou-se um outro ensaio de viabilidade celular, no qual se observou que, apesar de influenciar e diminuir a viabilidade dos AH após tratamento, a diminuição causada pela Met não é tão acentuada quanto nas linhas de GBM estudadas. No entanto, esta observação pode ser influenciada pela baixa taxa de proliferação dos AH em comparação com as linhas de GBM, podendo este facto ter consequências ao nível da diminuição da viabilidade celular. No entanto, os resultados observados são bastante positivos, uma vez que face ao mesmo tratamento, nas mesmas condições, a viabilidade celular dos AH é superior à viabilidade obtida em linhas de GBM.

Durante o desenvolvimento do presente estudo, surgiu a questão de que a diminuição da viabilidade celular associada ao tratamento com Met poderia estar a ser influenciada por eventos de morte celular, associada a fenómenos de choque osmótico. Para descartar esta possibilidade, foi efetuado um estudo de viabilidade celular nas linhas de GBM, utilizando as mesmas condições experimentais, mas onde foi incluído um veículo compensado com sacarose 50 mM. Os resultados obtidos foram concordantes com os ensaios anteriores, obtendo-se valores de viabilidade semelhantes para as mesmas condições, no mesmo tipo de células. Todavia, a hipótese inicialmente colocada não se veio a revelar pertinente, dado que no referido ensaio não se constataram diferenças significativas entre os dois veículos estudados. Tal observação permite concluir que a ação antitumoral da Met ao nível da diminuição da viabilidade celular não é influenciada por fenómenos de morte celular associados à ocorrência de choque osmótico.

Sabendo que a Met pode exercer efeitos antitumorais dependentes e independentes de AMPK, quis saber-se quais as possíveis vias envolvidas no efeito antitumoral evidenciado neste estudo e se o seu efeito neste caso específico é ou não mediado via dependente de AMPK. Para tal, estudou-se o efeito na viabilidade celular da Met associada ao inibidor conhecido da AMPK, cC, nas linhas U87 e U373. Observou-se uma diminuição da viabilidade celular em ambas as linhas de GBM, após tratamento só com cC (2,5 e 5 μ M). Este efeito é provavelmente derivado da inespecificidade do próprio composto, uma vez

que a sua ação inibitória não é exclusiva para a AMPK, inibindo também outras cinases de proteína essenciais para a sobrevivência celular (Bain *et al.*, 2007; Vogt *et al.*, 2011). Na análise da inibição da viabilidade celular, foi possível observar uma atenuação da inibição da viabilidade celular causada pela Met, na presença de cC. Os resultados sugerem que, devido à atenuação parcial do efeito da Met na viabilidade celular por ação do cC, o efeito antitumoral da Met seja mediado pela ativação da AMPK, ainda que, pelo menos, em parte.

A ciclina D é uma proteína envolvida na regulação do ciclo celular, cuja expressão pode indicar se este foi ou não interrompido (Lapenna & Giordano, 2009). A expressão da ciclina D atua com um indicador do estado de progressão do ciclo celular, uma vez que estando ativa indica que o ciclo celular prossegue sem problemas. Sabe-se que a ativação da AMPK tem consequências ao nível da paragem do ciclo celular (Strickland & Stoll, 2017). Durante a realização do trabalho experimental, observou-se que efeito antitumoral da Met pode ser mediado pela ativação da AMPK, ainda que, pelo menos, em parte. Estas informações levantam a questão de que, se a Met atua ao nível da ativação da AMPK e esta por sua vez inibe o ciclo celular, a diminuição da viabilidade celular de células de GBM após tratamento com Met possa ser provocada por uma paragem do ciclo celular. De forma a possibilitar uma futura abordagem ao tema do ponto de vista genético, procedeu-se à otimização de *primers* do gene da ciclina D, para futuramente se inferir acerca da sua expressão e determinar o estado de progressão do ciclo celular.

Esta otimização foi o primeiro passo na análise da expressão génica da ciclina D. O passo seguinte será avaliar a sua expressão em células de GBM após tratamento com Met. É esperada uma diminuição da sua expressão, uma vez que se observou através do estudo com cC que o mecanismo de ação antitumoral da Met é influenciada, pelo menos em parte, pela ação da AMPK. Caso se venha a observar que a expressão da ciclina D não sofre alteração, este estudo deverá continuar, desta vez com a análise da ocorrência de fenómenos apoptóticos.

Capítulo 6

6 Conclusões e Perspetivas Futuras

No presente estudo, observou-se que a viabilidade celular das linhas de GBM em estudo, U87 e U373, diminuiu substancialmente após tratamento com Met 10 e 25mM. Como descrito em estudos anteriores, constatou-se que a administração do inibidor da ADK, ABT-702, produziu um efeito inibitório na viabilidade celular das linhas de GBM, contrariamente à administração exógena de Ado. Tal conclusão é promissora, uma vez que, devido à rápida metabolização da Ado, a realização de reforços de 8h em 8h torna o processo mais moroso e complexo; a possibilidade de se obter o mesmo efeito através da administração de uma dose única de ABT-702 é bastante animadora neste sentido. Foi também possível observar que o tratamento combinado de Met e ABT-702 influencia a viabilidade celular dos AH de forma diferente em relação às linhas celulares de GBM em estudo. Este é um ponto favorável para uma terapêutica conjunta dos dois compostos em questão, uma vez que a situação ideal de todo o tratamento antitumoral é que este seja direcionado apenas para as células tumorais e não para as células saudáveis.

Observou-se, ainda, que a administração de concentrações elevadas de Met (10 e 25 mM) nas células tumorais U87 e U373 não provoca ocorrência de choque osmótico, o que permite concluir que a diminuição da viabilidade celular observada provocada pela Met não é influenciada por ocorrência de morte celular derivada de fenómenos induzidos por choque osmótico.

O tratamento conjunto de Met com cC permitiu estudar a influência da AMPK na ação antitumoral da Met. Uma vez que as células tratadas com Met 25 mM combinada com cC 5 μ M apresentaram uma diminuição da inibição da viabilidade celular, comparativamente ao efeito da Met obtido na ausência de cC, é possível concluir que a ação antitumoral da Met é mediada, pelo menos em parte, pela AMPK, dado que ao conjugar-se este composto com o inibidor de AMPK, a sua ação antitumoral diminuiu, tendo repercussão ao nível da viabilidade celular. Assim, pode concluir-se que o cC possui capacidade para reverter de forma parcial o efeito da Met. O próprio cC parece influenciar a viabilidade celular; todavia, este efeito deverá estar relacionado com a sua pouca especificidade para a AMPK, uma vez que a sua ação inibitória não é exclusiva da AMPK, inibindo, também, outras cinases de proteína essenciais para o processo de sobrevivência celular.

Com os resultados obtidos neste estudo, pode concluir-se que a aplicação de Ado e Met em contexto de GBM é uma possível abordagem antitumoral, nomeadamente através da promoção do aumento dos níveis intracelulares de Ado por ação do inibidor da ADK, ABT-702. Observou-se que o aumento dos níveis de Ado produz uma ação antitumoral cumulativa quando combinado com a Met.

A diminuição da viabilidade celular das linhas U87 e U373 pela Met levou ao surgimento de outras questões: a diminuição da viabilidade é provocada por uma diminuição da proliferação das células tumorais, resultante de uma paragem do ciclo celular? Ou será devido ao desencadeamento de fenómenos apoptóticos? Com vista a responder a estas questões e a fazer a ponte com as anteriores conclusões obtidas neste estudo, o passo seguinte seria desenvolver estudos de expressão de genes envolvidos em ambas as situações hipotéticas, através de ensaios de qPCR, após incubação das linhas celulares de GBM e AH com as referidas concentrações de Met (10 e 25 mM) e ABT-702 (15 µM), nomeadamente a análise da expressão da ciclina D. Uma vez que esta ciclina se encontra envolvida na regulação do ciclo celular, uma diminuição da sua expressão em relação a um gene de referência indicaria que o ciclo celular se encontraria interrompido, o que justificaria a diminuição da viabilidade celular. Se, por outro lado, a sua expressão permanecesse elevada, a etapa seguinte seria analisar, pela mesma técnica, a expressão da AMPK, dado que é um dos alvos da ação da Met. A otimização dos *primers* para o gene da ciclina D realizada no presente estudo é o primeiro passo no sentido dessa abordagem genética. Seria também interessante analisar a expressão de genes da via glicolítica, como a HK2 e, por consequência, a Bax (proteína pró-apoptótica membro da família Bcl-2), dado que a ação da Met se centra em reverter o Efeito de *Warburg*. Seria ainda necessário proceder à confirmação do efeito apoptótico, caso se observasse que o ciclo celular não sofre alterações, através da ativação das caspases por Western Blot, podendo ainda ser realizado um ensaio de citotoxicidade, através da quantificação da LDH (desidrogenase do lactato).

Os resultados obtidos neste estudo possibilitam a criação de novas abordagens anti-GBM, com a Ado a ter um papel de destaque, associada à Met. Embora as possibilidades sejam promissoras, mais estudos serão necessários para aprofundar a aplicação e compreender os mecanismos associados à terapêutica proposta no presente estudo, incluindo uma abordagem em termos genéticos.

Capítulo 7

7 Referências Bibliográficas

- Adeberg, S., Bernhardt, D., Harrabi, S. Ben, Bostel, T., Mohr, A., Koelsche, C., Diehl, C., Rieken, S., & Debus, J. (2015). Metformin influences progression in diabetic glioblastoma patients. *Strahlentherapie Und Onkologie*, *191*(12), 928–935.
- Adeberg, S., Bernhardt, D., Harrabi, S. B., Nicolay, N. H., Hörner-Rieber, J., König, L., Repka, M., Mohr, A., Abdollahi, A., Weber, K. J., Debus, J., & Rieken, S. (2017). Metformin enhanced in vitro radiosensitivity associates with G2/M cell cycle arrest and elevated adenosine-5'-monophosphate-activated protein kinase levels in glioblastoma. *Radiology and Oncology*, *51*(4), 431–437.
- Agnihotri, S., & Zadeh, G. (2016). Metabolic reprogramming in glioblastoma: The influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. *Neuro-Oncology*, *18*(2), 160–172.
- Alarcón, S., Niechi, I., Toledo, F., Sobrevia, L., & Quezada, C. (2019). Glioma progression in diabetes. *Molecular Aspects of Medicine*, *66*, 62–70.
- Antonioli, L., Haskó, G., Fornai, M., & Colucci, R. (2014). *Expert Opinion on Therapeutic Targets Adenosine pathway and cancer : where do we go from here ? Adenosine pathway and cancer : where do we go from here ? 8222*.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., Mclauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S. C., Alessi, D. R., & Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: A further update. *Biochemical Journal*, *408*(3), 297–315.
- Boison, D. (2013). Adenosine kinase: Exploitation for therapeutic gain. *Pharmacological Reviews*, *65*(3), 906–943.
- Boison, D., & Yegutkin, G. G. (2019). Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. *Cancer Cell*, *36*(6), 582–596.
- Borea, P. A., Varani, K., Vincenzi, F., Baraldi, P. G., Tabrizi, M. A., Merighi, S., & Gessi, S. (2015). The A₃ adenosine receptor: history and perspectives. *Pharmacological Reviews*, *67*, 74–102.

- Brey, E. M., & McIntire, L. V. (2008). Vascular Assembly in Engineered and Natural Tissues. In *Principles of Regenerative Medicine*. Elsevier Inc.
- Bryukhovetskiy, I., Ponomarenko, A., Lyakhova, I., Zaitsev, S., Zayats, Y., Korneyko, M., Eliseikina, M., Mischenko, P., Shevchenko, V., Sharma, H. S., Sharma, A., & Khotimchenko, Y. (2018). Personalized regulation of glioblastoma cancer stem cells based on biomedical technologies: From theory to experiment (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 42, 691–702.
- Ceruti, S., & Abbracchio, M. P. (2020). Adenosine Signaling in Glioma Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1202, 13–33.
- Chhipa, R. R., Fan, Q., Anderson, J., Muraleedharan, R., Ciruolo, G., Chen, X., Waclaw, R., Chow, L. M., Kofron, M., Weirauch, M. T., Kendler, A., Ratner, N., Nakano, I., Dasgupta, N., Komurov, K., & Dasgupta, B. (2018). AMP Kinase Promotes Glioblastoma Bioenergetics and Tumor Growth Rishi. *Nat Cell Biol.*, 20(7), 823–835.
- Dasgupta, B., & Seibel, W. (2018). Compound C/Dorsomorphin: Its Use and Misuse as an AMPK Inhibitor. In *AMPK. Methods in Molecular Biology* (Vol. 1732, pp. 195–202).
- Duan, K., Liu, Z. jian, Hu, S. qiong, Huo, H. yu, Xu, Z. ru, Ruan, J. fei, Sun, Y., Dai, L. ping, Yan, C. bao, Xiong, W., Cui, Q. hua, Yu, H. jing, Yu, M., & Qin, Y. (2018). Lactic acid induces lactate transport and glycolysis/OXPHOS interconversion in glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(2), 888–894.
- El-Masry, O. S., Al-Sakkaf, K., Brown, B. L., & Dobson, P. R. M. (2015). Differential crosstalk between the AMPK and PI3K/Akt pathways in breast cancer cells of differing genotypes: Leptin inhibits the effectiveness of AMPK activation. *Oncology Reports*, 34(4), 1675–1680.
- Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B. J., Viollet, B., Mamer, O. A., Avizonis, D., Deberardinis, R. J., Siegel, P. M., & Jones, R. G. (2013). AMPK is a negative regulator of the warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metabolism*, 17(1), 113–124.

- Faubert, B., Vincent, E. E., Poffenberger, M. C., & Jones, R. G. (2014). The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator. *Cancer Letters*, *356*(2), 165–170.
- Han, H. R., Park, S. A., Ahn, S., Jeun, S. S., & Ryu, C. H. (2019). Evaluation of combination treatment effect with TRAIL-secreting mesenchymal stem cells and compound C against Glioblastoma. *Anticancer Research*, *39*(12), 6635–6643.
- Hassan, M. Al, Fakhoury, I., Masri, Z. El, Ghazale, N., Dennaoui, R., Atat, O. El, Kanaan, A., & El-sibai, M. (2018). Metformin Treatment Inhibits Motility and Invasion of Glioblastoma Cancer Cells. *Analytical Cellular Pathology*, 1–9.
- He, L., & Wondisford, F. E. (2015). Metformin action: Concentrations matter. *Cell Metabolism*, *21*(2), 159–162.
- Heckman-Stoddard, B. M., DeCensi, A., Sahasrabudde, V. V., & Ford, L. G. (2017). Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence. *Diabetologia*, *60*(9), 1639–1647.
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, *324*(5930), 1029–1033.
- Huang, W., Ding, X., Ye, H., Wang, J., Shao, J., & Huang, T. (2018). Hypoxia enhances the migration and invasion of human glioblastoma U87 cells through PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway. *NeuroReport*, *29*(18), 1578–1585.
- Jawhari, S., Ratinaud, M.-H., & Verdier, M. (2016). Glioblastoma , hypoxia and autophagy : a survival-prone ‘ ménage-à-trois .’ *Cell Death and Disease*, *7*, 1–10.
- Kim, J., & You, Y. J. (2017). Regulation of organelle function by metformin. *IUBMB Life*, *69*(7), 459–469.
- Kinaan, M., Ding, H., & Triggle, C. R. (2015). Metformin: An Old Drug for the Treatment of Diabetes but a New Drug for the Protection of the Endothelium. *Medical Principles and Practice*, *24*(5), 401–415.
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 469–472.

- Labak, C. M., Wang, P. Y., Arora, R., Guda, M. R., Asuthkar, S., & Andrew, J. (2016). Glucose transport : meeting the metabolic demands of cancer , and applications in glioblastoma treatment. *American Journal of Cancer Research*, 6(8), 1599–1608.
- Łabuzek, K., Suchy, D., Gabryel, B., Bielecka, A., Liber, S., & Okopień, B. (2010). Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacological Reports*, 62(5), 956–965.
- Lapenna, S., & Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(7), 547–566.
- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger, G., & Weller, M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, 80(August), 101896.
- Li, M., Wang, D., He, J., Chen, L., & Li, H. (2019). Bcl-XL: A multifunctional anti-apoptotic protein. *Pharmacological Research*, 151, 104547.
- Liu, B., Ding, L., Zhang, L., Wang, S., Wang, Y., Wang, B., & Li, L. (2019). Baicalein Induces Autophagy and Apoptosis through AMPK Pathway in Human Glioma Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, 47(6), 1405–1418.
- Liu, X., Chhipa, R. R., Nakano, I., & Dasgupta, B. (2014). The AMPK inhibitor Compound C is a potent AMPK-independent anti-glioma agent. *Mol Cancer Ther*, 13(3), 596–605.
- Marcelino, H., Carvalho, T. M. A., Tomás, J., Teles, F. I., Honório, A. C., Rosa, C. B., Costa, A. R., Costa, B. M., Santos, C. R. A., Sebastião, A. M., & Cascalheira, J. F. (2021). Adenosine inhibits cell proliferation differently in human astrocytes and in glioblastoma cell lines. *Neuroscience*, 467, 122–133.
- Marcelino, H., Nogueira, V. C., Santos, C. R. A., Quelhas, P., Carvalho, T. M. A., Fonseca-Gomes, J., Tomás, J., Diógenes, M. J., Sebastião, A. M., & Cascalheira, J. F. (2020). Adenosine inhibits human astrocyte proliferation independently of adenosine receptor activation. *Journal of Neurochemistry*, 153(4), 455–467.
- Masters, J. R. W., & Palsson, B. (2002). *Human Cell Culture, Vol. II: Cancer Cell Lines Part 2*. Kluwer Academic Publishers.

- Mazurek, M., Litak, J., Kamieniak, P., Kulesza, B., Jonak, K., Baj, J., & Grochowski, C. (2020). Metformin as potential therapy for high-grade glioma. *Cancers*, *12*(1), 1–29.
- Motaln, H., Koren, A., Gruden, K., Ramsak, Z., Schichor, C., & Lah, T. T. (2015). Heterogeneous glioblastoma cell cross-talk promotes phenotype alterations and enhanced drug resistance. *Oncotarget*, *6*(38), 40998–41017.
- Onorati, A. V., Dyczynski, M., Ojha, R., & Amaravadi, R. K. (2018). Targeting autophagy in cancer. *Cancer*, *124*(16), 3307–3318.
- Patel, A. P., Fisher, J. L., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abraha, H. N., Agius, D., Alahdab, F., Alam, T., Allen, C. A., Anber, N. H., Awasthi, A., Badali, H., Belachew, A. B., Bijani, A., Bjørge, T., Carvalho, F., Catalá-López, F., ... Fitzmaurice, C. (2019). Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, *18*(4), 376–393.
- Ríos, M., Foretz, M., Viollet, B., Prieto, A., Fraga, M., Costoya, J. A., & Senarís, R. (2013). AMPK activation by oncogenesis is required to maintain cancer cell proliferation in astrocytic tumors. *Cancer Research*, *73*(8), 2628–2638.
- Sai, K., Yang, D., Yamamoto, H., Fujikawa, H., Yamamoto, S., Nagata, T., Saito, M., Yamamura, T., & Nishizaki, T. (2006). A1 adenosine receptor signal and AMPK involving caspase-9/-3 activation are responsible for adenosine-induced RCR-1 astrocytoma cell death. *NeuroToxicology*, *27*(4), 458–467.
- Sanli, T., Steinberg, G. R., Singh, G., & Tsakiridis, T. (2014). AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism. *Cancer Biology & Therapy*, *15*(2), 156–169.
- Saraei, P., Asadi, I., Kakar, M. A., & Moradi-Kor, N. (2019). The beneficial effects of metformin on cancer prevention and therapy: A comprehensive review of recent advances. *Cancer Management and Research*, *11*, 3295–3313.
- Sasmita, A. O., Wong, Y. P., & Ling, A. P. K. (2018). Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, *14*(1), 40–51.

- Seliger, C., Genbrugge, E., Gorlia, T., Chinot, O., Stupp, R., Nabors, B., Weller, M., & Hau, P. (2020). Use of metformin and outcome of patients with newly diagnosed glioblastoma: Pooled analysis. *International Journal of Cancer*, *146*(3), 803–809.
- Seliger, C., Luber, C., Gerken, M., Schaertl, J., Proescholdt, M., Riemenschneider, M. J., Meier, C. R., Bogdahn, U., Leitzmann, M. F., Klinkhammer-Schalke, M., & Hau, P. (2019). Use of metformin and survival of patients with high-grade glioma. *International Journal of Cancer*, *144*(2), 273–280.
- Serrano, B. P., & Hardy, J. A. (2018). Phosphorylation by protein kinase A disassembles the caspase-9 core. *Cell Death and Differentiation*, *25*, 1025–1039.
- Sesen, J., Dahan, P., Scotland, S. J., Saland, E., Dang, V., Lemarié, A., Tyler, B. M., Brem, H., Toulas, C., Moyal, C.-J. E., Sarry, J.-E., & Skuli, N. (2015). Metformin Inhibits Growth of Human Glioblastoma Cells and Enhances Therapeutic Response. *PLOS ONE*, *10*(4), 1–24.
- Shi, W. Y., Xiao, D., Wang, L., Dong, L. H., Yan, Z. X., Shen, Z. X., Chen, S. J., Chen, Y., & Zhao, W. L. (2012). Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death and Disease*, *3*(3), 1–9.
- Siegel, G. J., Albers, R. W., Brady, P. D. S. T., & Ph, D. (2006). Basic Neurochemistry s eve n t h e d i t i o n. In *Ion Channels*.
- Strickland, M., & Stoll, E. A. (2017). Metabolic reprogramming in glioma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *5*(APR).
- Thirupathi, A., & Chang, Y. Z. (2019). Role of AMPK and its molecular intermediates in subjugating cancer survival mechanism. *Life Sciences*, *227*(April), 30–38.
- Valdés, F. Z., Luna, V. Z., Arévalo, B. R., Brown, N. V., & Gutiérrez, M. C. (2018). Adenosine: Synthetic Methods of Its Derivatives and Antitumor Activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, *18*(20), 1684–1701.
- Valtorta, S., Dico, A. Lo, Raccagni, I., Gaglio, D., Belloli, S., Politi, L. S., Martelli, C., Diceglie, C., Bonanomi, M., Ercoli, G., Vaira, V., Ottobrini, L., & Moresco, R. M. (2017). Metformin and temozolomide , a synergic option to overcome resistance in glioblastoma multiforme models. *Oncotarget*, *8*(68), 113090–113104.

- Vogt, J., Traynor, R., & Sapkota, G. P. (2011). The specificities of small molecule inhibitors of the TGF β and BMP pathways. *Cellular Signalling*, 23(11), 1831–1842.
- Vucicevic, L., Misirkic, M., Janjetovic, K., Vilimanovich, U., Sudar, E., Isenovic, E., Prica, M., Harhaji-Trajkovic, L., Kravic-Stevovic, T., Bumbasirevic, V., & Trajkovic, V. (2011). Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy*, 7(1), 40–50.
- Waker, C. A., & Lober, R. M. (2019). Brain Tumors of Glial Origin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1190, 281–297.
- Wang, Y. W., He, S. J., Feng, X., Cheng, J., Luo, Y. T., Tian, L., & Huang, Q. (2017). Metformin: A review of its potential indications. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 2421–2429.
- Wolf, A., Agnihotri, S., & Guha, A. (2010). Targeting Metabolic Remodeling in Glioblastoma Multiforme. *Oncotarget*, 1(7), 552–577.
- Wróbel, M. P., Marek, B., Kajdaniuk, D., Rokicka, D., Szymborska-kajaneck, A., & Strojek, K. (2017). Metformin — a new old drug. *Endokrynologia Polska*, 68(4), 482–496.
- Xie, Y., Wang, J. L., Ji, M., Yuan, Z. F., Peng, Z., Zhang, Y., Wen, J. G., & Shi, H. R. (2014). Regulation of insulin-like growth factor signaling by metformin in endometrial cancer cells. *Oncology Letters*, 8(5), 1993–1999.
- Xiong, Z. S., Gong, S. F., Si, W., Jiang, T., Li, Q. L., Wang, T. J., Wang, W. J., Wu, R. Y., & Jiang, K. (2019). Effect of metformin on cell proliferation, apoptosis, migration and invasion in A172 glioma cells and its mechanisms. *Molecular Medicine Reports*, 20(2), 887–894.
- Yang, D., Yaguchi, T., Nakano, T., & Nishizaki, T. (2011). Adenosine activates AMPK to phosphorylate Bcl-X L responsible for mitochondrial damage and diablo release in HuH-7 cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 27(1), 71–78.
- Yuen, C. A., Asuthkar, S., Guda, M. R., Tsung, A. J., & Velpula, K. K. (2016). Cancer stem cell molecular reprogramming of the Warburg effect in glioblastomas : a new target gleaned from an old concept. *CNS Oncology*, 5(2), 101–108.