

Efeito anti tumoral dos canabinóides em glioblastoma: modulação pela adenosina

Carolina Boialvo Rosa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor José Francisco da Silva Cascalheira
Co-orientadora: Prof^a. Doutora Helena Tomás Marcelino Lopes

junho de 2020

O conteúdo desta Dissertação é da exclusiva responsabilidade da autora

(Carolina Boialvo Rosa)

Agradecimentos

Durante a elaboração desta tese foram diversas as pessoas que comigo colaboraram para que tudo decorresse da melhor forma possível. Quero assim agradecer a todos aqueles, que direta ou indiretamente me ajudaram a alcançar este objetivo.

Ao meu orientador, Professor Doutor José Francisco Cascalheira, agradeço a oportunidade de trabalhar no seu grupo de investigação, a orientação científica ao longo do ano, todos conhecimentos transmitidos, a dedicação, motivação e compreensão que teve sempre para comigo. Foi um privilégio trabalhar sob a sua orientação.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Helena Marcelino, agradeço todos os conhecimentos científicos e laboratoriais transmitidos, dedicação, motivação, compreensão e disponibilidade a qualquer hora do dia. Agradeço, igualmente, os conselhos, os raspanetes, a paciência, a força e a amizade que sempre me deu. Foi muito bom aprender consigo e poder trabalhar ao seu lado.

À minha colega de laboratório, Ana Cláudia Honório, agradeço a disponibilidade e cooperação nos diversos trabalhos a todas as horas do dia, bem como a paciência, força e amizade.

A todos os amigos e colegas com quem me cruzei durante estes anos e que fizeram com que a passagem pela Covilhã fosse das melhores fases da minha vida. Obrigada aos amigos de sempre, aos que chegaram de novo e a todos os colegas do CICS que diariamente tinham um sorriso.

À minha família, em especial aos meus avós, por serem uma fonte de tranquilidade, carinho e amor.

Aos meus pais e ao meu irmão, que são o meu mundo, agradeço tudo! Agradeço serem os pilares que sustentam todas as minhas fraquezas e medos, por serem o meu porto seguro e por terem sempre a palavra certa. Obrigada por todo carinho, compreensão, motivação, paciência e amor que me têm. Sem vós seria impossível.

Lista de Publicações

Luís A, Marcelino H, Rosa C, Domingues F, Pereira L, Cascalheira JF. 2020. The effects of cannabinoids on glioblastoma growth: a systematic review with meta-analysis of animal model studies. *European J. Pharmacology* 876: 173055.

Marcelino H, Honório AC, Rosa CB, Carvalho TMA, Tomás J, Costa BM, Santos CRA, Sebastião AM, Cascalheira JF. 2020. Adenosine inhibits cell proliferation in human astrocytes but not in glioblastoma cell lines. (Submetido)

Lista de Comunicações Científicas

Apresentações em Congressos

Apresentações orais

Honório AC, Rosa CB, Marcelino H, Cascalheira JF. “Evaluation of the expression of enzymes involved in adenosine metabolism in Glioblastoma under increased adenosine concentrations”, XIV Annual CICS-UBI Symposium. Covilhã, Portugal, 4–5 Julho, 2019.

Rosa CB, Honório AC, Marcelino H, Cascalheira JF. “Anti-tumoral effect of cannabinoids on glioblastoma: modulation by adenosine”, XIV Annual CICS-UBI Symposium. Covilhã, Portugal, 4–5 Julho, 2019.

Apresentações em Poster

Luís A, Marcelino H, Rosa C, Domingues F, Pereira L, Cascalheira JF. “The effects of cannabinoids on glioblastoma growth: results from a meta-analysis of animal model studies”, III International Congress in Health Sciences Research – towards innovation and entrepreneurship: Trends in Aging and Cancer, Covilhã, 14 – 16 Novembro, 2019.

Resumo

Os gliomas, tumores do sistema nervoso central (SNC), incluem a maioria dos tumores cerebrais malignos, e constituem uma importante causa de morte por cancro em todo o mundo. Deste grupo de tumores faz parte o glioblastoma (GBM), astrocitoma de grau IV e a forma mais maligna de gliomas, com elevada heterogeneidade celular, grande capacidade infiltrativa, baixa metastização, reincidência local, resistência às terapêuticas e baixa taxa de sobrevivência. Os tratamentos disponíveis não têm apresentado resultados satisfatórios, por isso é necessário recorrer a metodologias inovadoras e direcionadas para as singularidades das células de GBM.

O uso de derivados de *Cannabis sativa L.* tem suscitado um interesse particular devido aos seus efeitos anti-proliferativos, pró-apoptóticos e anti-tumorais, particularmente em células de GBM. Nessas células, os canabinóides atuam através dos recetores do tipo 1 e 2 (CB1 e CB2, respetivamente), acoplados a proteína G. Os genes dos recetores dos canabinóides são regulados pela metilação das suas regiões promotoras. A adenosina (Ado), a qual se acumula nas regiões de hipoxia encontradas no GBM, pode regular a metilação de diversos genes. O presente trabalho teve como objetivo, investigar a possibilidade de concentrações elevadas de Ado puderem modular o efeito anti-tumoral dos canabinóides e a expressão de recetores destes em GBM. Para tal, o efeito de um agonista sintético não seletivo dos recetores CB1 e CB2, o Win 55 212-2 (Win), na viabilidade/proliferação celular e na citotoxicidade em linhas celulares GBM foi avaliado usando os ensaios de MTT e de libertação da desidrogenase do lactato (LDH), respetivamente. A expressão do recetor CB1, mais comum no sistema nervoso, foi avaliada por PCR em tempo real (RT-PCR).

Começou-se por testar qual a concentração de Win com melhor efeito anti-proliferativo em três linhas de GBM (U373, U87 e SNB19) e em células de astrócitos humanos normais (HA). As células foram incubadas por 72 h na presença de Win. Inicialmente, foi estudada uma gama de concentrações de Win entre 0,1 μM e 30 μM ; a concentração de 5 μM foi selecionada para estudos posteriores, pois produziu 60%-90% de inibição da proliferação/viabilidade celular em todas as células estudadas. Noutras experiências as células foram incubadas durante 72h com Win (5 μM), na presença ou na ausência de Ado (30 μM) e na presença ou na ausência de um *cocktail* de antagonistas dos recetores da adenosina (C.A.). Em algumas experiências, a concentração endógena de Ado foi aumentada usando um inibidor da cinase da Ado, o ABT-702 (30 μM) (ABT).

Na presença de C.A., a Ado foi capaz de reduzir a inibição da proliferação/viabilidade celular induzida pelo Win, em células U373, enquanto que o ABT na presença de C.A. reduziu a inibição da proliferação/viabilidade celular induzida por Win nas linhas

U373, U87, SNB19 e em HA. O facto da atenuação do efeito anti-proliferativo do Win pela Ado exógena, nas células U373, e pelo aumento da Ado endógena pelo ABT, em todos os tipos de células estudadas, não ser prevenida pelo bloqueio dos recetores da Ado pelo CA, indica que esta atenuação não é mediada por ativação dos recetores da Ado.

No caso dos ensaios de citotoxicidade, o Win (5 μ M) produziu um aumento da libertação de LDH em todas as células estudadas, quer na ausência quer na presença do C.A. O ABT (30 μ M) na presença de C.A. reduziu a inibição da libertação de LDH induzida por Win apenas na linha U87 e em HA.

A expressão do gene do recetor CB1 dos canabinóides foi avaliada nas três linhas celulares de GBM e em HA, tratadas com Ado ou ABT, e observou-se que na linha U87 houve uma redução na expressão do recetor CB1 na presença de ABT.

Em conclusão, Win causou uma diminuição acentuada na proliferação/viabilidade celular e um aumento na morte celular avaliada pela libertação de LDH em todas as três linhas celulares de GBM e em HA. O efeito anti-proliferativo e citotóxico de Win foi significativamente atenuado pelo aumento da concentração de Ado através de um mecanismo independente de recetor em todas as três linhas celulares GBM estudadas.

Palavras-chave

Glioblastoma, canabinóides, adenosina, astrócitos e recetores CB1

Abstract

Gliomas, central nervous system tumors, include most malignant brain tumors and constitute a major cause of cancer related death around the world. This group of tumors includes glioblastoma (GBM), a grade IV astrocytoma and the most malignant form of gliomas, with high cellular heterogeneity, great infiltrative capacity, low metastazation rate, high local recurrence, resistance to therapies and low survival rate. The available treatments have not shown satisfactory results, thus it is necessary to seek innovative and targeted methods to deal with GBM cell's singularities.

Cannabis sativa L. derivatives' use has raised an interest due to its anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumoral effects, especially in GBM cells. In these cells, cannabinoids act through coupled protein G type 1 and 2 receptors (CB1 and CB2, respectively). Cannabinoid receptor genes are regulated by methylation of their promoter regions. Adenosine (Ado) accumulates in hypoxic regions found in GBM and can regulate the methylation of multiple genes. The present study aimed to investigate the possibility that high concentrations of Ado could modulate the anti-tumoral effect of cannabinoids and the expression of their receptor in GBM. For this purpose, the effect of a non-selective synthetic agonist of CB1 and CB2 receptors, Win 55212-2 (Win), on cellular viability/proliferation and cytotoxicity in GBM cell lines was evaluated using MTT assays and lactate dehydrogenase assays, respectively. CB1 receptor expression, the most common in the nervous system, was evaluated by real time PCR (RT-PCR).

It was started by testing which Win concentration had the best anti-proliferative effect on three GBM cell lines (U373, U87 and SNB19) and normal human astrocyte cells (HA). The cells were incubated for 72h in the presence of Win. Initially, it was studied a Win concentration range between 0,1 μM and 30 μM ; 5 μM was the selected concentration to future studies, since it produced a 60%-90% inhibition of proliferation/viability of all the studied cells. In the following experiments, the cells were incubated for 72h with Win (5 μM), in the presence or absence of Ado (30 μM) and the presence or absence of an antagonist cocktail of adenosine receptors (CA). In some experiments, the endogenous Ado concentration was increased using an adenosine kinase inhibitor, ABT-702 (30 μM) (ABT).

In the presence of CA, Ado could reduce the cellular proliferation/viability inhibition induced by Win, in U373 cells, while ABT in the presence of CA reduced the cellular

proliferation/viability inhibition induced by Win in U373, U87, SNB19 cell lines and HA. The mitigation of Win's anti-proliferative effect by exogenous Ado, in U373 cells, and the increase of endogenous Ado by ABT, in all studied cells, is not prevented by the blockage of Ado's receptors by CA, which indicates that this effect is not mediated by Ado receptors activation.

In cytotoxicity assays, Win (5 μM) produced an increase of LDH release in all studied cells, in the presence and absence of CA. ABT (30 μM) in the presence of CA reduced the inhibition of the LDH's release induced by Win, in U87 and HA.

Cannabinoid CB₁ receptor gene expression was evaluated in the three GBM cell lines and HA, treated with Ado or ABT and it was found that there was a reduction in the expression of CB₁ receptor in the U87 cell line, in the presence of ABT.

In conclusion, Win caused an accentuated decrease in cell proliferation/viability and an increase in cell death evaluated by LDH assay in all three GBM cell lines and HA. The anti-proliferative and cytotoxic effects of Win was significantly mitigated by the increase of Ado's concentration by a receptor independent mechanism in all studied GBM cell lines.

Keywords

Glioblastoma, cannabinoids, adenosine, astrocytes, CB₁ receptors.

Índice

Capítulo A	1
Introdução	3
1 Tumores do sistema nervoso central	3
1.1 Glioblastoma	7
1.2 Modelos terapêuticos convencionais para GBM	10
2 Canabinóides	11
2.1 Estrutura e propriedades dos canabinóides	11
2.2 Recetores de canabinóides	12
2.3 Classes de canabinóides	14
2.3.1 Endocanabinóides	14
2.3.1.1 Sistema endocanabinóides	15
2.3.2 Fitocanabinóides	16
2.3.3 Canabinóides sintéticos	17
2.3.3.1 Win 55 212-2	18
2.4 Ação dos canabinóides no GBM	19
3 Adenosina	23
3.1 Estrutura e síntese da adenosina	23
3.2 Recetores da adenosina	25
3.3 Uso da adenosina na terapêutica	26
3.4 Ação da adenosina no GBM	27
4 Objetivo	28
Capítulo B	29
Materiais e Métodos	31
1 Fármacos e reagentes	31
2 Linhas celulares	32
2.1 Linha celular U373	32
2.2 Linha celular U87	32
2.3 Linha celular SNB19	33
2.4 Cultura celular	34
2.4.1 Passagem de células	34
2.4.2 Contagem de células	35
2.4.3 Densidades celulares	35

3 Viabilidade celular (MTT)	36
3.1 Determinação do EC ₅₀ do Win nas linhas de GBM e HS	36
3.2 Determinação do efeito do Win na ausência ou na presença de Ado/ABT e na ausência ou na presença de cocktail de antagonistas dos recetores da Ado, nas linhas de GBM e HA	38
4 Avaliação da citotoxicidade celular (LDH)	40
5 Ensaio para a extração de RNA total	41
5.1 Extração do RNA total	42
5.2 Avaliação da integridade do RNA total	43
5.3 Quantificação do RNA total	43
5.4 Tratamento do RNA total	43
6 Síntese de DNA complementar	44
7 Desenho de <i>primers</i> e PCR convencional	45
8 PCR em tempo real	46
9 Avaliação Estatística	47
 Capítulo C	 49
Resultados	51
1 Avaliação do efeito de um agonista dos recetores dos canabinóides na viabilidade/proliferação celular Expressão do Recetor CB1 nas diferentes linhas de GBM e HA	51
1.1 Avaliação do efeito na viabilidade/proliferação celular utilizando um intervalo de concentrações de Win, para linhas de GBM	51
1.2 Avaliação do efeito na viabilidade/proliferação celular utilizando um intervalo de concentrações de Win, para os HA	55
1.3 Avaliação da curva Dose – Resposta (EC ₅₀)	56
2 Avaliação da influência do aumento da concentração de adenosina no efeito inibitório do Win 5 µM na viabilidade/proliferação celular	58
2.1 Avaliação da influência da adenosina exógena no efeito inibitório do Win 5 µM na viabilidade/proliferação celular	59
2.2 Avaliação da influência de um inibidor da ADK no efeito inibitório do Win 5 µM na viabilidade/proliferação celular	64
2.3 Avaliação da influência da adenosina exógena e de um inibidor da ADK na percentagem de inibição produzida pelo Win 5 µM na viabilidade/proliferação celular	68

3 Avaliação da influência do aumento da concentração de adenosina na citotoxicidade celular induzida pelo Win – Ensaio LDH	72
3.1 Avaliação da influência da adenosina exógena e de um inibidor da ADK na percentagem de efeito produzido pelo Win 5 µM na libertação de LDH	79
4 Avaliação do efeito do aumento da concentração da adenosina na expressão de CB1	83
4.1 Expressão do recetor CB1 nas diferentes linhas de GBM e HA	83
4.1.1 PCR convencional	83
4.1.2 PCR em tempo real	84
Capítulo D	87
Discussão	89
Capítulo E	93
Conclusão	95
Capítulo F	97
Referências Bibliográficas	99

Lista de Figuras

Figura 1 – Classificação Geral dos Tumores do SNC	4
Figura 2 - Taxas de incidência dos tumores cerebrais por país	6
Figura 3 - Taxas de incidência de GBM por idade e sexo	8
Figura 4 - Estrutura de endocanabinóides	14
Figura 5 - Sistema Endocanabinoide	15
Figura 6 - Estrutura de fitocanabinoides	16
Figura 7 - Estrutura de CS	17
Figura 8 – Estrutura do Win	18
Figura 9 – Modulação de GBM por canabinóides	19
Figura 10 - Efeito dos canabinóides na viabilidade de células gliais e de glioma	21
Figura 11 – Estrutura química da adenosina	23
Figura 12 - Esquema do metabolismo intracelular da adenosina	23
Figura 13 – Representação Esquemática do metabolismo da ADO	24
Figura 14 – Morfologia das linhas celulares de GBM em cultura	33
Figura 15 – Ensaio com concentrações de Win de 0,1 μ M a 30 μ M, para linhas de GBM	36
Figura 16 – Ensaio com concentrações de Win de 0.1 μ M a 5 μ M, para HA	37
Figura 17 – Ensaio para concentração de Win 5 μ M, na presença ou ausência de C.A e na presença ou ausência de Ado/ABT	38
Figura 18 – Ensaio para recolha de RNA	41
Figura 19 – Viabilidade/proliferação celular da linha U373 para concentrações de Win entre 0,1 μ M e 30 μ M	52
Figura 20 – Viabilidade/proliferação celular da linha U87 para concentrações de Win entre 0,1 μ M e 30 μ M	53
Figura 21 – Viabilidade/proliferação celular da linha SNB19 para concentrações de Win entre 0,1 μ M e 30 μ M	54
Figura 22 – Viabilidade/proliferação celular dos HA para concentrações de Win entre 0,1 μ M e 5 μ M	55
Figura 23 – Curva Dose-Resposta para as linhas U373, U87 e SNB19	56
Figura 24 – Curva Dose-Resposta para os HA	57
Figura 25 - Viabilidade/proliferação celular da linha U373 obtida na presença de Win (5 μ M) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de Ado (30 μ M)	60

Figura 26 - Viabilidade/proliferação celular da linha U87 obtida na presença de Win (5 μ M) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de Ado (30 μ M)	61
Figura 27 - Viabilidade/proliferação celular da linha SNB19 obtida na presença de Win (5 μ M) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de Ado (30 μ M)	62
Figura 28 - Viabilidade/proliferação celular do HA obtida na presença de Win (5 μ M) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de Ado (30 μ M)	63
Figura 29 - Viabilidade/proliferação celular da linha U373 obtida na presença de Win (5 μ M) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de ABT (30 μ M)	64
Figura 30 - Viabilidade/proliferação celular da linha U87 obtida na presença de Win (5 μ M) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de ABT (30 μ M)	65
Figura 31 - Viabilidade/proliferação celular da linha SNB19 obtida na presença de Win (5 μ M) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de ABT (30 μ M)	66
Figura 32 - Viabilidade/proliferação celular do HA obtida na presença de Win (5 μ M) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de ABT (30 μ M).	67
Figura 33 - Influência da Ado e do ABT na percentagem de inibição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo Win 5 μ M, para a linha U373	69
Figura 34 - Influência da Ado e do ABT na percentagem de inibição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo Win 5 μ M, para a linha U87	70
Figura 35 - Influência da Ado e do ABT na percentagem de inibição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo Win 5 μ M, para a linha SNB19	70
Figura 36 - Influência da Ado e do ABT na percentagem de inibição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo Win 5 μ M, para os HA	71
Figura 37 - Atividade da LDH libertada (μ U/1000 células) para a linha U373 obtida na presença de Win 5 μ M na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de a) ABT (30 μ M) ou b) Ado (30 μ M)	73

Figura 38 – Atividade da LDH libertada ($\mu\text{U}/1000$ células) para a linha U87 obtida na presença de Win $5 \mu\text{M}$ na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de a) ABT ($30 \mu\text{M}$) ou b) Ado ($30 \mu\text{M}$)	75
Figura 39 – Atividade da LDH libertada ($\mu\text{U}/1000$ células) para a linha SNB19 obtida na presença de Win $5 \mu\text{M}$ na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de a) ABT ($30 \mu\text{M}$) ou b) Ado ($30 \mu\text{M}$)	76
Figura 40 – Atividade da LDH libertada ($\mu\text{U}/1000$ células) para os HA obtida na presença de Win $5 \mu\text{M}$ na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de a) ABT ($30 \mu\text{M}$) ou b) Ado ($30 \mu\text{M}$)	78
Figura 41 – Influência da Ado (a) e do ABT (b) no efeito do Win $5 \mu\text{M}$ na libertação de LDH, para a linha U373	80
Figura 42 – Influência da Ado (a) e do ABT (b) no efeito do Win $5 \mu\text{M}$ na libertação de LDH, para a linha U87	81
Figura 43 – Influência da Ado (a) e do ABT (b) no efeito do Win $5 \mu\text{M}$ na libertação de LDH, para a linha SNB19	81
Figura 44 – Influência da Ado (a) e do ABT (b) no efeito do Win $5 \mu\text{M}$ na libertação de LDH, para os HA	82
Figura 45 – Eletroforese em gel de agarose 2% corado com <i>GreenSafe</i> dos produtos de PCR do cDNA utilizando um par de <i>primers</i> específicos para o gene do recetor CB1	83
Figura 46 – Efeito da Ado ($30 \mu\text{M}$) e do ABT ($15 \mu\text{M}$) nos níveis de expressão do mRNA do gene do recetor CB1 na linha U373	85
Figura 47 – Efeito da Ado ($30 \mu\text{M}$) e do ABT ($15 \mu\text{M}$) nos níveis de expressão do mRNA do gene do recetor CB1 na linha U87	85
Figura 48 – Efeito da Ado ($30 \mu\text{M}$) e do ABT ($15 \mu\text{M}$) nos níveis de expressão do mRNA do gene do recetor CB1 na linha SNB19	86
Figura 49 – Efeito da Ado ($30 \mu\text{M}$) e do ABT ($15 \mu\text{M}$) nos níveis de expressão do mRNA do gene do recetor CB1 nos HA	86

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação de Glioblastomas	7
Tabela 2 – Sequências dos <i>Primers</i> dos genes utilizados neste estudo	45

Lista de Abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
ABT	ABT-702
ADA	Desaminase da adenosina
ADK	Cinase da adenosina
Ado	Adenosina
ADP	Difosfato da adenosina
AEA	Anandamida
AGS	Suplemento de crescimento de astrócitos (<i>Astrocyte growth supplement</i>)
AM	Meio de cultura de astrócitos (<i>Astrocyte medium</i>)
AMP	Monofosfato de adenosina
AMT	Transportador comum de alta afinidade
ATP	Trifosfato de adenosina
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
C.A.	<i>Cocktail</i> de antagonistas dos recetores da adenosina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CB1	Recetor tipo 1 de canabinóides
CB2	Recetor tipo 2 de canabinóides
CBD	Canabidiol
cDNA	DNA complementar
CN	Controlo negativo
CSC	Células estaminais tumorais
CS	Canabinóides sintéticos
DAG	1-acil-2-araquidonoilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DPCPX	<i>8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine</i>
ECS	Sistema Endocanabinóide
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

epm	Erro padrão médio
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
EtNH ₂	Etanolamina
EUA	Estados Unidos da América
FAAH	Hidrolase da amida dos ácidos gordos
FBS	Soro Bovino Fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
GBM	Glioblastoma
HA	Astrócitos Humanos
H3K9me3	Lisina 9 da histona 3
JNK	Cinase do N-terminal do c-Jun
LDH	Desidrogenase do Lactato
MAPKp38	Cinase da Proteína ativada por mitogénio
MGL	Lipase monoacilglicerol específica
MGMT	Metiltransferase da O6-metilguanina do DNA
MRE3008F20	<i>N</i> -[2-(2-Furanyl)-8-propyl-8H-pyrazolo[4,3- <i>e</i>][1,2,4]triazolo[1,5- <i>c</i>]pyrimidin-5-yl]- <i>N'</i> -(4-methoxyphenyl)urea
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MRS1754	<i>N</i> -(4-Cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1 <i>H</i> -purin-8-yl)phenoxy]-acetamide
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAPE	N-araquidonoilfosfatidiletanolamina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI3K	3-cinase do fosfatidilinositol
PKA	Cinase A de proteína
PKC	Cinase C de proteína
PLD	Fosfolipase D
P/S	Penicilina/Estreptomicina (<i>penicilin/estreptomicina</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto
RTK	Recetor cinase de tirosina
RT-PCR	PCR em tempo real
SAH	S-adenosil-homocisteína

SAM	S-adenosilmetionina
SCH58261	<i>2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNB19	Linha celular de GBM SNB19
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TAE	Tris-Acetato-EDTA
THC	Tetrahidrocanabinol
TMZ	Temozolomide
Tri	<i>Tri-reagent</i>
UV	Ultravioleta
U373	Linha celular de GBM U373
U87	Linha celular de GBM U87
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
Win	Win 55 212-2 <i>-(R)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone mesylate)</i>
2 AG	2-araquidonoil glicerol

Capítulo A

Introdução

1 Tumores do sistema nervoso central

O sistema nervoso central (SNC) composto pelo encéfalo e pela medula espinal encontra-se protegido pelo crânio, meninges, líquido cefalorraquidiano e barreira hematoencefálica. Tem como função integrar, interpretar e enviar mensagens para as diversas funções e estruturas do organismo (Marieb and Hoehn, 2007).

Devido à elevada importância do SNC para o bom funcionamento do organismo humano, as patologias que lhe são inerentes necessitam de estudos constantes. Os tumores do SNC, nomeadamente os gliomas, são exemplo disso. Surgem, a cada ano nos Estados Unidos da América (EUA) cerca de 23 000 novos casos, dos quais resultaram na morte de 16050 doentes em 2016, tornando este tipo de tumores um importante foco de estudo na área de neurociências (Anjum *et al.*, 2017; Massi *et al.*, 2004).

Em consequência da elevada heterogeneidade de subtipos de tumores do SNC, houve a necessidade de classificá-los. A primeira classificação dos tumores cerebrais foi em feita em 1863 por Rudolf Virchow (Banan and Hartmann, 2017) e só um século depois, em 1979, é que a Organização Mundial de Saúde (OMS), categorizou os tumores dos SNC, pela primeira vez (Banan and Hartmann, 2017).

Os tumores cerebrais dividiam-se, exclusivamente, em 4 grupos: gliomas, tumores neurais, neoplasias indeterminadas e meningiomas (Banan and Hartmann, 2017). No ano de 2007 a OMS atribuiu diferentes graus de malignidade (I, II, III e IV) e dividiu os gliomas em subgrupos distintos (Anjum *et al.*, 2017; Louis *et al.*, 2007), como esquematizado na Figura 1.

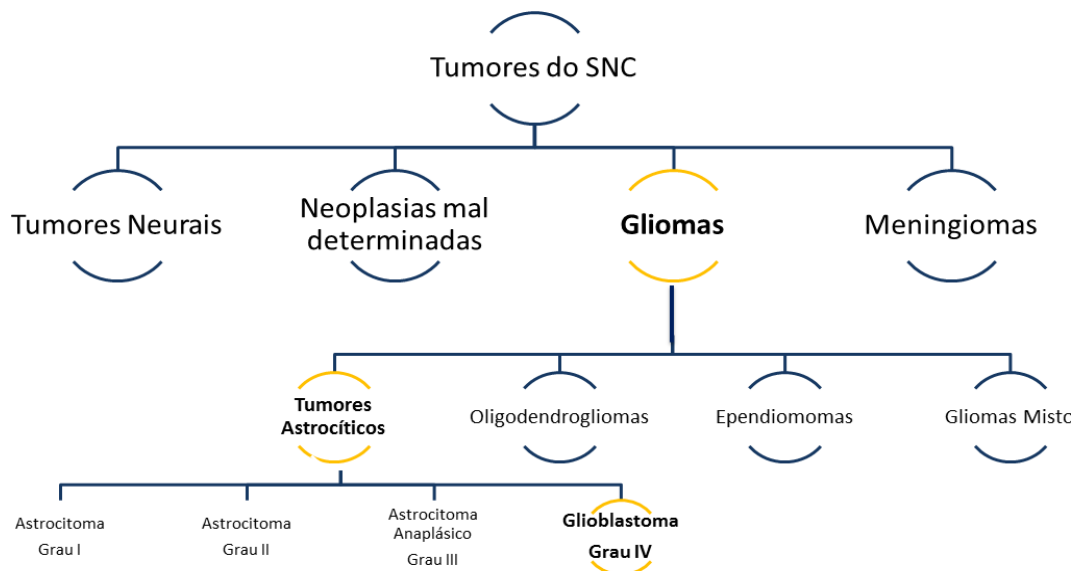


Figura 1 – Classificação Geral dos Tumores do SNC. Representação esquemática da classificação dos Tumores do SNC segundo a OMS (Anjum *et al.*, 2017; Banan and Hartmann, 2017; Louis *et al.*, 2007)

A OMS fez em 2016 a última atualização na classificação dos tumores do SNC. Esta classificação é uma reformulação da 4ª Edição, de 2007, mas com numerosas alterações, onde pela primeira vez se utilizou parâmetros moleculares, para além da histologia, para classificar os tumores (Louis *et al.*, 2016). Foram reestruturados os gliomas difusos, meduloblastomas e tumores embrionários, e adicionadas novas entidades tumorais, facilitando os estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos. As alterações epigenéticas permitiram distinguir entre: oligodendrogliomas (gliomas de grau II e III, que afetam pacientes jovens e apresentam prognóstico mais favorável e maior sensibilidade à terapia); e astrocitomas (gliomas de grau I a IV e com maior taxa de incidência entre os 75 e os 84 anos de idade (Gusyatine and Hegi, 2018; Hanif *et al.*, 2017; Kros *et al.*, 2015; Ostrom *et al.*, 2018).

De entre os tumores do SNC, os gliomas representam o grupo mais frequente de neoplasia cerebral em humanos - 31% a 35% dos tumores intracranianos primários (De Jesús *et al.*, 2010; Hanif *et al.*, 2017; Malmir *et al.*, 2018) e 80% dos tumores cerebrais malignos, diagnosticados nos EUA, sendo a causa de 2,5% das mortes por cancro.

Estudos recentes demonstram que o pico de incidência de gliomas é na idade adulta entre os 55 e os 60 anos de idade (Hanif *et al.*, 2017), embora em crianças dos 0 aos 14 representem um rácio de 2,8 em cada 100 000 pessoas. É a terceira causa mais relevante de morte em pacientes dos 15 aos 34 anos (Malmir *et al.*, 2018; Ostrom *et al.*, 2018).

Denominam-se por gliomas porque tem origem em células da glia (Kros *et al.*, 2015) e os seus portadores têm um tempo de vida médio variável consoante o tipo e o grau do

glioma, desencadeando sempre a morte do paciente, exceto os gliomas de grau I que são benignos e os únicos potencialmente curáveis (De Jesús *et al.*, 2010).

A formação de tumores envolve alteração de mecanismos epigenéticos tais como: hipometilação do DNA (Gusyatine and Hegi, 2018), modificação de histonas, remodelação da cromatina ou alteração da expressão de RNA não codificante (Crespo *et al.*, 2015). Também alterações metabólicas e reprogramação da atividade das células proporcionam a aquisição e manutenção das propriedades do fenótipo maligno, facilitando a sobrevivência das células cancerígenas sob condições de *stress* como alterações bioenergéticas, biossintéticas e de balanços de oxidação redução (DeBerardinis and Chandel, 2016).

Mutações nos genes moduladores epigenéticos produzem alterações na metilação do DNA e têm vindo a ser utilizadas como biomarcadores essenciais na classificação tumoral, direcionando a evolução biológica dos gliomas e decisões clínicas (Gusyatine and Hegi, 2018). No caso particular dos gliomas há uma grande variedade de alterações epigenéticas que induzem variações na expressão glial normal, sem alterar a sequência de aminoácidos (Crespo *et al.*, 2015).

O prognóstico dos diferentes graus de malignidade dos gliomas depende de diversas variáveis como: tipo histopatológico, idade de diagnóstico, sexo, raça, etnia e localização geográfica (Ostrom *et al.*, 2018).

A localização geográfica influencia as taxas de incidência, estando os gliomas a afetar mais o mundo ocidental, principalmente a Europa (5,5 casos por cada 100 000), seguindo-se a América do Norte (5,3 casos por cada 100 000) (Hanif *et al.*, 2017), como demonstrado na Figura 2. Desta forma o perfil mais favorável ao desenvolvimento de gliomas é homem adulto, raça branca e etnia não hispânica (Salazar *et al.*, 2009; Thakkar *et al.*, 2014).

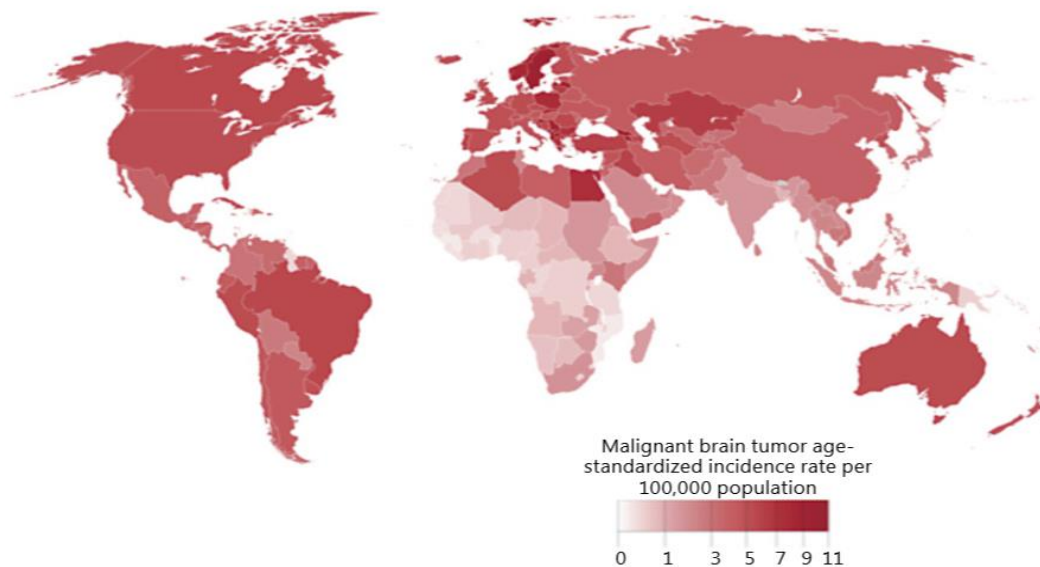


Figura 2 - Taxas de incidência dos tumores cerebrais por país. Taxas de incidência padronizadas por idade de tumores cerebrais malignos por 100 000 pessoas em 2012 em cada país (adaptado de Ostrom Q.T. *et al.*, 2018)

Através de ensaios clínicos realizados concluiu-se que os agentes modificadores epigenéticos isolados não são suficientes, mas a sua combinação molecular com outras drogas e a conjugação com terapias direcionadas/convencionais são fulcrais para o tratamento de gliomas (Louis *et al.*, 2007).

A base deste estudo é o glioblastoma (GBM), pertence ao subgrupo de tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos (Louis *et al.*, 2016).

1.1 Glioblastoma

O GBM é um astrocitoma de grau IV, segundo a classificação da OMS (Crespo *et al.*, 2015; Gusyatine and Hegi, 2018; Louis *et al.*, 2007), que apresenta heterogeneidade intratumoral e capacidade de invadir o tecido cerebral normal (é infiltrativo) (Torres *et al.*, 2016). É a forma mais maligna e comum dos gliomas (Anjum *et al.*, 2017; DeBerardinis and Chandel, 2016), responsável por 50% dos gliomas (Thakkar *et al.*, 2014) e 30% de todos os tumores do SNC (Bastien *et al.*, 2015). O GBM pertence ao grupo de tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos, da classificação de 2016 da OMS (Louis *et al.*, 2016; Thakkar *et al.*, 2014), define-se como uma neoplasia astrocítica de alto grau com presença de proliferação celular descontrolada, necrose tumoral (Aldape *et al.*, 2015), invasão difusa, resistência à apoptose, angiogênese, instabilidade genómica generalizada, atipia nuclear e trombos vasculares (Bastien *et al.*, 2015).

De forma a facilitar os estudos experimentais, decisões clínicas e para uma melhor organização, utilizou-se diversos parâmetros para agrupar os GBM, tal como descrito na Tabela 1 (Bastien *et al.*, 2015; Motaln *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Classificação de Glioblastomas (adaptado de Bastien J.I., *et al.*, 2015; Motaln H., *et al.*, 2015)

Metodologia	Definição
História	Primário – sem evidência de lesão precursora
Clínica	Secundário – com histórico de progressão da doença
Expressão Génica	Pró-neural – superexpressão de genes associados ao desenvolvimento cerebral normal e neurogênese, bom prognóstico Neural Clássico Mesenquimal – perfil altamente proliferativo, mau prognóstico
Ploidia	Monogénicos – um clone de células tumorais pseudodiploides e células do estroma Poligénicos – múltiplos clones de células tumorais com células pseudodiploides

Atualmente é uma doença incurável com um tempo estimado de sobrevivência de aproximadamente quinze meses, quando tratada, e três meses sem tratamento (Aldape *et al.*, 2015; Massi *et al.*, 2004; Thakkar *et al.*, 2014), apresentando os maiores índices de letalidade (Aguado *et al.*, 2007; Burnstock, 2013; Motaln *et al.*, 2015) e uma taxa de incidência de 3,2 doentes por cada 100 000 pessoas (Gusyatine and Hegi, 2018). À semelhança dos gliomas em geral, também o GBM apresentam incidência 1,6 vezes superior no sexo masculino, traduzindo-se numa percentagem de 3,97% dos homens contra os 2,53% das mulheres (Anjum *et al.*, 2017; Thakkar *et al.*, 2014). O mesmo acontece entre raças, onde os brancos têm duas vezes maior probabilidade em contrair GBM do que os negros (3,45% vs 1,67%, respetivamente) (Thakkar *et al.*, 2014). A idade é um terceiro fator que influencia, embora afete pacientes de todas as idades, é em adultos que este tipo de tumores é mais incidente (Burnstock, 2013; DeBerardinis and Chandel, 2016), havendo uma relação entre o aumento da idade e o aumento da incidência, tal como estudado (Thakkar *et al.*, 2014) e demonstrado na Figura 3.

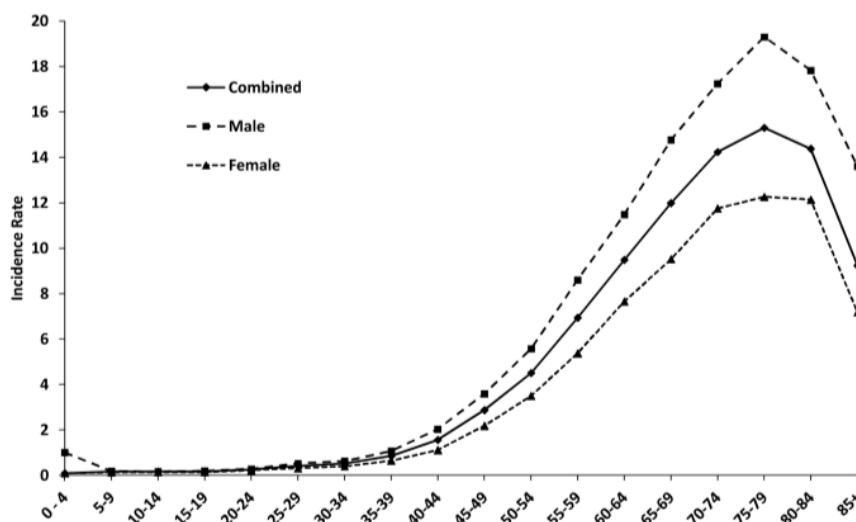


Figura 3 - Taxas de incidência de GBM por idade e sexo. Taxas ajustadas por idade e específicas para GBM por idade de diagnóstico e sexo, relatório estatístico CBTRUS: NPCR e SEER, 2006–2010 (adaptado de Thakkar J.P. *et al.*, 2014).

Tanto gliomas como GBM, raramente metastizam, mas facilmente se infiltram no tecido cerebral saudável circundante (DeBerardinis and Chandel, 2016). A elevada taxa de letalidade deve-se à infiltração unicelular no parênquima cerebral normal, à sua reincidência local e resistência à terapêutica (Aldape *et al.*, 2015; Anjum *et al.*, 2017; DeBerardinis and Chandel, 2016; Motaln *et al.*, 2015).

O GBM localiza-se anatomicamente na região supratentorial, sendo o lóbulo frontal o mais afetado (Thakkar *et al.*, 2014).

As áreas de GBM, devido a serem abundantemente heterogêneas, apresentam elevadas e descontroladas taxas proliferativas e invasivas, com regiões apoptóticas, necróticas e angiogênicas intensivas (Motaln *et al.*, 2015), instabilidade genômica generalizada (Bastien *et al.*, 2015), elevada migração que produz lesões metacrônicas e promove a disseminação pelo parênquima cerebral (DeBerardinis and Chandel, 2016).

No GBM existem muitas alterações genéticas e moleculares que levam a modificações de várias vias de sinalização importantes promovendo o crescimento e progressão tumoral. As vias mais importantes alteradas no GBM são as iniciadas por fatores de crescimento associados a recetores de tirosina (RTK) e a via da 3-cinase do fosfatidilinositol (PI3K) (Crespo *et al.*, 2015).

Apesar da elevada complexidade do GBM, que torna de extrema dificuldade a seleção da decisão clínica e dos processos terapêuticos mais adequados (Anjum *et al.*, 2017), existem alterações genéticas e vários marcadores moleculares clinicamente relevantes para a melhoria de estratégias terapêuticas atuais (Aldape *et al.*, 2015).

1.2 Modelos terapêuticos convencionais para GBM

O GBM ostenta propriedades específicas, que tornam este subtipo de glioma uma doença incurável, com prognóstico reservado, elevada resistência às terapias e que faz com que haja poucos avanços da área nos últimos anos (Aguado *et al.*, 2007; Anjum *et al.*, 2017; Bastien *et al.*, 2015; De Jesús *et al.*, 2010; DeBerardinis and Chandel, 2016; Gusyatine and Hegi, 2018; Thakkar *et al.*, 2014).

O rearranjo rápido das vias de sinalização, a inacessibilidade face à permeabilidade seletiva da barreira hemato-encefálica e a incapacidade de atingir todas as células tumorais com as metodologias terapêuticas convencionais, e alterações epigenéticas conferem elevada resistência ao tratamento de GBM (Massi *et al.*, 2004). As alterações genéticas e epigenéticas das células tumorais do glioma maligno são a principal causa para a quimioresistência a um amplo espectro de drogas anti-tumorais (Ellert-Miklaszewska *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2016). As frequentes situações de recorrência devem-se ao elevado índice de proliferação das células tumorais e resistência aos tratamentos (Daniele *et al.*, 2014).

As estratégias terapêuticas mais utilizadas atualmente consistem na cirurgia de remoção, radioterapia com feixe externo (Massi *et al.*, 2004) e quimioterapia com temozolomide (TMZ) – agente farmacológico utilizado no tratamento de gliomas que promove o retardamento dos efeitos colaterais e evolução dos tumores (Aldape *et al.*, 2015; Anjum *et al.*, 2017; Bastien *et al.*, 2015; Daniele *et al.*, 2014; DeBerardinis and Chandel, 2016; Thakkar *et al.*, 2014). O TMZ é utilizado em tratamento de curta duração pois em casos de longa duração as células ganham resistência a esta droga. O TMZ só é eficaz em células que apresentem a alteração epigenética de hipermetilação da região promotora do gene metiltransferase da O6-metilguanina do DNA (MGMT). Uma outra abordagem de tratamentos para o GB, é o recurso a agentes anti-angiogênicos e imunoterapêuticos para melhorar o prognóstico (Torres *et al.*, 2016).

A radiação ionizante induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que afetam o DNA genômico, provocando dano no DNA, iniciando vias de sinalização celular que promovem a morte celular (Massi *et al.*, 2004).

A investigação na área tem centrado o seu estudo no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, nomeadamente existem dados que corroboram a eficácia dos canabinóides no tratamento de várias patologias, em particular nos tumores do SNC, assunto que será discutido ao longo do trabalho, na perspectiva de encontrar novas e eficazes alternativas terapêuticas no tratamento de GB.

2 Canabinóides

2.1 Estrutura e propriedades dos canabinóides

A planta *Cannabis sativa L.*, vulgarmente conhecida como *cannabis* (Pinto, 2016) é cultivada há milénios com diversas finalidades (Grayson, 2015). Esta planta é a fonte de canabinóides bioativos para fins medicinais (Burnstock, 2013), embora o seu uso recorrente seja devido às propriedades recreativas que apresenta (Anjum *et al.*, 2017).

No último século foi excluída das investigações devido aos conhecidos efeitos psicoativos e pelos problemas de legalização, mas atualmente foi readmitida, em legitimidade, por reivindicações crescentes dos benefícios médicos que dispõe (Grayson, 2015). Segundo a OMS é a droga ilícita mais utilizada globalmente, estimando-se que em 2013 cerca de 181,18 milhões de pessoas entre os 15 e os 64 anos usaram-na para fins não terapêuticos (Le Boisselier *et al.*, 2017).

O *cannabis* apresenta uma alargada gama de compostos químicos, aproximadamente 400, de onde se destacam os canabinóides (Pinto, 2016). Esta espécie está sob investigação para uso em produtos farmacêuticos (Grayson, 2015), sendo crescentes os estudos na área, embora as autoridades enfatizem os riscos do uso de *cannabis* como o acelerar do início da esquizofrenia.

Os canabinóides são um grupo de compostos químicos estruturalmente heterogêneos com diversas origens (Burnstock, 2013; Le Boisselier *et al.*, 2017) e estrutura terpenofenólica em C₂₁ (Pinto, 2016). De entre as suas capacidades destacam-se a inibição da proliferação celular em vários tipos de tumores, em particular nos gliomas, o comprometimento da angiogénese (Anjum *et al.*, 2017), um efeito anti-invasivo potente (DeBerardinis and Chandel, 2016), a indução da apoptose das células de glioma *in vitro* e *in vivo* (Williams-Karnesky *et al.*, 2013) e a atividade imunossupressora, imunomoduladora e neuroprotetora (Sheng *et al.*, 2004). Os processos oncogénicos não são os únicos onde os canabinóides atuam, desempenhando um papel importante na regulação de diferentes mecanismos fisiológicos como a modulação da dor, da função imunológica, da recompensa e do apetite, da termorregulação e regulação da inflamação (Anjum *et al.*, 2017; Grayson, 2015; Massi *et al.*, 2004).

A ação dos canabinóides deve-se à presença nas células de recetores de canabinóides tipo 1 e 2 (Le Boisselier *et al.*, 2017).

2.2 Recetores dos canabinóides

Na década de 60 do século XX foram clonados, pela primeira vez, os recetores dos canabinóides, tendo sido alvo de constantes e progressivos estudos que permitiram conhecer, atualmente, dois recetores diferentes dos canabinóides: o recetor do tipo 1 (CB1) e o recetor do tipo 2 (CB2) (Anjum *et al.*, 2017; Daniele *et al.*, 2014; De Jesús *et al.*, 2010; Le Boisselier *et al.*, 2017; Marieb and Hoehn, 2007), que medeiam uma ampla gama de efeitos centrais e periféricos no sistema nervoso (Burnstock, 2013).

Os dois tipos de recetores, com sete domínios transmembranares, encontram-se acoplados à proteína G da membrana plasmática (Ivanov and Hei, 2017; Le Boisselier *et al.*, 2017; Marieb and Hoehn, 2007; Velasco *et al.*, 2005). Diferenciam-se entre si por possuírem diferentes sequências de aminoácidos, distintos mecanismos de sinalização, distintos papéis fisiológicos (Anjum *et al.*, 2017; Burnstock, 2013; Dumitru *et al.*, 2018; Ellert-Miklaszewska *et al.*, 2005), diferente seletividade farmacológica e distribuição tecidual desigual (De Jesús *et al.*, 2010).

O recetores CB1 e o CB2 não têm, exclusivamente, a capacidade de reconhecer e interagir com os canabinóides provenientes do *cannabis*, embora se designem por canabinóides todos os compostos químicos naturais ou artificiais que ativem os recetores CB1 e CB2 (Pinto, 2016). Estes quando ativados podem desencadear mecanismos de sinalização como: inibição da ciclase do adenililo, aumento da produção de ceramidas, ativação da cinase p38 de proteína ativada por mitogénico (MAPKp38) e da PI3K e regulação dos canais de Ca^{2+} e K^+ (Dumitru *et al.*, 2018).

O recetor CB1 está presente de forma efetiva e abundante no SNC (Echigo *et al.*, 2012), com maior densidade no bolbo olfativo, mas de igual forma importante em regiões como córtex cerebral (responsável por processos emocionais e cognitivos), hipocampo (associado à memória) (D'Addario *et al.*, 2013), gânglios de base, cerebelo e terminais nervosos periféricos (Anjum *et al.*, 2017; Burnstock, 2013; De Jesús *et al.*, 2010; Marieb and Hoehn, 2007; Massi *et al.*, 2004). A sua expressão tem sido descrita tanto em astrócitos como em neurónios. Também tem a capacidade de se expressar no sistema nervoso periférico (SNP), embora de forma menos efetiva (Le Boisselier *et al.*, 2017), e em locais extra-neurais (Daniele *et al.*, 2014) como o endotélio vascular, útero, testículos, olhos - intra-ocular, amígdalas, baço (Anjum *et al.*, 2017), osso, coração, fígado, pulmão e sistema reprodutivo (Cadieux *et al.*, 2006; Le Boisselier *et al.*, 2017; Mills *et al.*, 2015).

A ativação de CB1 inibe a ciclase do adenililo e a formação do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) reduzindo por conseguinte processos de fosforilação mediados pela cinase A de proteína (PKA) (Cadieux *et al.*, 2006), suprime o crescimento celular

(Echigo *et al.*, 2012). Por outro lado, agindo fundamentalmente por sinalização retrógrada regula as funções sinápticas, suprime a libertação de neurotransmissores, evidenciando um papel neuromodulador (Ortega *et al.*, 2015). Tem a aptidão de controlar a atividade motora, de memória, cognição, apetite e processos sensoriais, influenciar as propriedades analgésicas devido a estar presente no SNP – gânglios da raiz dorsal e tecidos periféricos (Pinto, 2016) e modular canais iónicos: inibindo os de cálcio (Ca²⁺) e ativando os de potássio (K⁺) (Burnstock, 2013; Le Boisselier *et al.*, 2017; Marieb and Hoehn, 2007; Velasco *et al.*, 2005).

O recetor CB2 presente no tecido periférico (Mills *et al.*, 2015) desempenha um importante papel no sistema imunológico (Echigo *et al.*, 2012) , sendo expresso em células imunitárias (Anjum *et al.*, 2017; Ceruti and Abbrachio, 2013; Cadieux *et al.*, 2006; D’Addario *et al.*, 2013 ; Massi *et al.*, 2004; Pinto, 2016)e do sistema hematopoiético . (Le Boisselier *et al.*, 2017). Participam na modulação do sistema imunitário uma vez que modificam a libertação de citocinas (Pinto, 2016) e podem induzir a imunossupressão (D’Addario *et al.*, 2013). No cérebro a sua expressão foi detetada em microglia (Burnstock, 2013; De Jesús *et al.*, 2010).

No SNC predomina o recetor CB1, em comparação com o CB2, sugerindo que CB1 é o principal responsável pela atividade psicoativa dos canabinóides exógenos e pelo efeito fisiológico dos endocanabinóides (Le Boisselier *et al.*, 2017). Echigo *et al.*, 2012 sugerem ainda que o efeito anti-tumoral e anti-inflamatório dos canabinóides pode ser mediado via recetor CB1 (Echigo *et al.*, 2012).

Aquando da clonagem dos recetores CB1 e CB2 foi possível perceber que existia uma classe de canabinóides endógenos, diferente daquela que se conhecia de canabinóides exógenos (Costa *et al.*, 2016).

2.3 Classes de canabinóides

Após serem clonados os recetores de canabinóides foram descobertos os ligandos endógenos e desenvolvidos alguns canabinóides sintéticos (Burnstock, 2013; Costa *et al.*, 2016). Houve assim a necessidade de agrupar os canabinóides e subdividi-los em grupos distintos (Anjum *et al.*, 2017). Os três grupos apresentam uma ampla gama de atividades farmacológicas que afetam o cérebro, sistema imune e várias funções dependendo do subtipo de recetor a que se liga e qual o nível de afinidade (Le Boisselier *et al.*, 2017). Atualmente é de conhecimento geral que os três tipos afetam a taxa de proliferação de linhas celulares derivadas do SNC (Massi *et al.*, 2004).

2.3.1 Endocanabinóides – também conhecidos por canabinóides endógenos (Pinto, 2016), são produzidos por mamíferos, nos neurónios pós-sinápticos e nas células da glia onde desempenham atividade neuroprotetora (Burnstock, 2013). Atuam como mediadores lipídicos (Anjum *et al.*, 2017), sendo sintetizados a partir de fosfolípidos da membrana celular por enzimas específicas (D’Addario *et al.*, 2013; Dumitru *et al.*, 2018). Temos como exemplo o 2-araquidinoil glicerol (2-AG) e a anandamida (AEA) (Le Boisselier *et al.*, 2017).

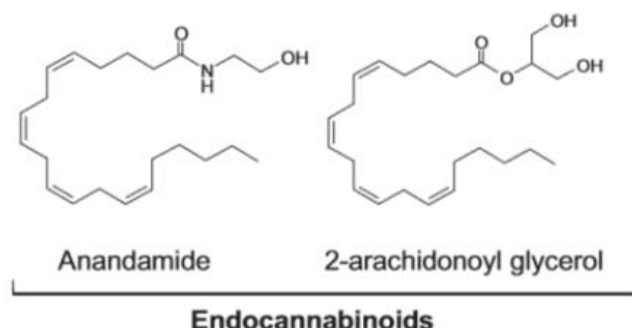


Figura 4 - Estrutura de Endocanabinoides. Estrutura química dos principais endocanabinoides: anandamida e 2-araquidonoil glicerol (adaptado de Le Boisselier *et al.*, 2017)

São lipofílos e não podem ser armazenados em vesículas, o que faz com que sejam sintetizados e libertados momentaneamente por vias biossintéticas que incluem a fosfolipase D (PLD) (D’Addario *et al.*, 2013). Atravessam livremente a membrana celular, embora existam mecanismos que facilitam a internalização, como o transportador de membrana de alta afinidade que permite a captação destes pelas células (Burnstock, 2013).

Ligam-se posteriormente, aos recetores CB1 e CB2, ativando-os e produzindo ações fisiológicas (Pinto, 2016), inibindo a libertação de neurotransmissores, por sinalização retrógrada (Le Boisselier *et al.*, 2017).

2.3.1.1 Sistema endocanabinóide

O sistema endocanabinoide (ECS) é complexo e multimodal (Le Boisselier *et al.*, 2017), composto por canabinóides endógenos e exógenos, pelos seus recetores (CB1 e CB2), pelo sistema enzimático envolvido no transporte, síntese e degradação dos mesmos (Burnstock, 2013; Costa *et al.*, 2016; D'Addario *et al.*, 2013; Pinto, 2016).

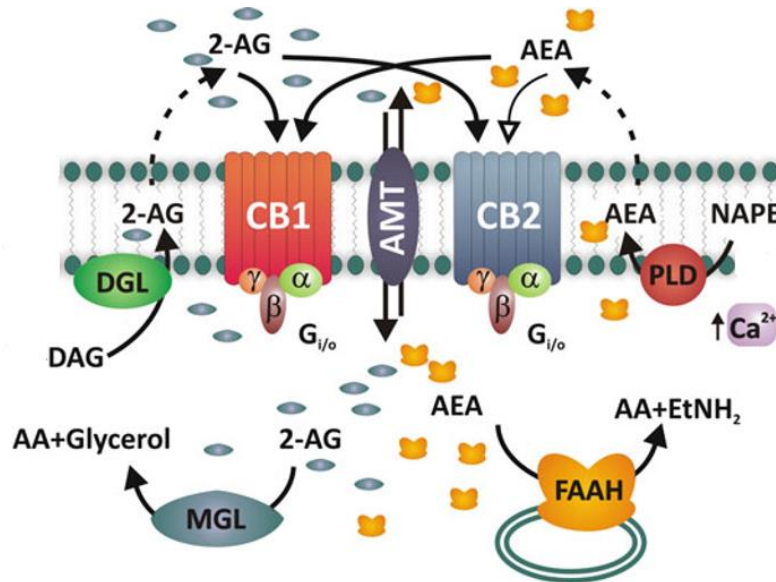


Figura 5 - Sistema Endocanabinoide. Os endocanabinóides AEA e 2-AG são sintetizados por clivagem de precursores lipídicos em resposta ao aumento dos níveis de Ca²⁺ ou por estimulação dos recetores. O N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE) é hidrolisado pela fosfolipase D (PLD) originando AEA. O 2-AG é sintetizado através da hidrólise de 1-acil-2-araquidonoilglicerol (DAG) pela lipase do diacilglicerol (DGL). AEA e 2-AG são rapidamente removidos do espaço extracelular, por um transportador comum de alta afinidade (AMT), que opera em ambos os sentidos. Uma vez absorvidos pelas células, o AEA é um substrato da hidrolase da amida dos ácidos gordos (FAAH), que forma ácido araquidónico (AA) e etanolamina (EtNH₂). O 2-AG é degradado principalmente por uma lipase monoacilglicerol específica (MGL) em AA e Glicerol. O AEA e o 2-AG ligam-se e ativam os recetores CB1 e CB2; no entanto o AEA é um agonista parcial para o CB2 (adaptado de Ceruti and Abbrachio, 2013).

Ao ECS são atribuídas múltiplas funções quer em situações fisiológicas quer patológicas do SNC e dos órgãos periféricos (D'Addario *et al.*, 2013). Está envolvido na regulação de diversas funções fisiológicas (Le Boisselier *et al.*, 2017) como processos cognitivos, controlo de comportamento e controlo motor, memória, sensação de dor, apetite, homeostase, função cardiovascular, motilidade gastrointestinal, imunorregulação, controlo do destino natural das células (Pinto, 2016) e inibição da inflamação (Ortega *et al.*, 2015).

As principais sinapses afetadas pelo ECS por sinalização retrógrada são as glutamatérgicas e GABAérgicas, que têm forte expressão de CB1 (Le Boisselier *et al.*, 2017).

2.3.2 Fitocannabinoides - canabinóides exógenos com origem vegetal, provenientes da *Cannabis sativa L.*. Foram estudados, até ao momento mais de 70 tipos diferentes (Burnstock, 2013), de entre os quais se destaca o tetrahidrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD) (Anjum *et al.*, 2017; Marieb and Hoehn, 2007). O THC é o principal composto psicoativo do *cannabis*, possuindo afinidade moderada para recetores CB1 e CB2 (Ivanov and Hei, 2017), contrariamente ao CBD que tem baixa afinidade para ambos (Le Boisselier *et al.*, 2017).

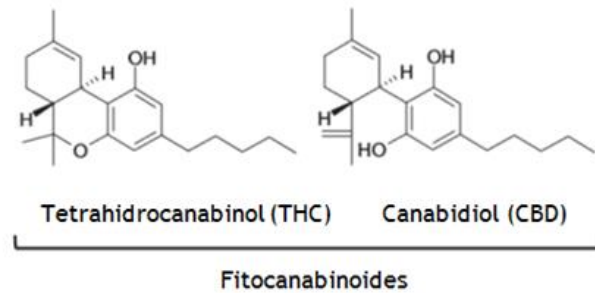


Figura 6 - Estrutura de fitocannabinoides. Estrutura química dos principais fitocannabinoides: Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD) (adaptado de Le Boisselier *et al.*, 2017)

O CBD não possui atividade intrínseca significativa sobre os recetores de canabinóides, portanto não produz efeitos colaterais psicotrópicos e adversos, o que o torna um dos constituintes bioativos com maior potencial para uso terapêutico (Massi *et al.*, 2004). As suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras são inequívocas. Por outro lado tem sido descrita a capacidade de desencadear a apoptose em células de glioma, por ativação das vias dependentes do p53 (Ivanov and Hei, 2017). *In vivo* o CBD tem eficácia na redução do crescimento tumoral, o que poderá ser utilizado como estratégia terapêutica para gliomas (Massi *et al.*, 2004).

2.3.3 Canabinóides sintéticos (CS) – canabinóides exógenos, com ação idêntica aos canabinóides endógenos, mas aos quais foi alterada a estrutura química (Burnstock, 2013). Foram sintetizados nos anos 60, após a descoberta de THC (Mills *et al.*, 2015), para serem utilizados como potenciais alvos terapêuticos e para explorar o ECS (Castaneto *et al.*, 2014).

Os CS demonstram *in vivo* e *in vitro* efeitos farmacológicos semelhantes ao THC, mas com maior intensidade, 2 a 100 vezes mais potentes, no efeito analgésico, anticonvulsivo, anti-inflamatório, anticancerígeno e na perda de peso (Castaneto *et al.*, 2014). A sua elevada popularidade deve-se aos efeitos psicoativos intensos que apresentam, baixo custo económico de produção e falta de detetabilidade em exames de rotina da tela das drogas de rotina (Mills *et al.*, 2015).

A maioria dos CS são agonistas não específicos de CB1 e CB2, apresentando maior afinidade para CB1, comparativamente com CB2, predominantemente localizados nos terminais pré-sinápticos (Castaneto *et al.*, 2014). Possuem estrutura comum que inclui um núcleo principal unido a uma porção secundária – cadeia alquila – por uma ligação de carbono (Le Boisselier *et al.*, 2017).

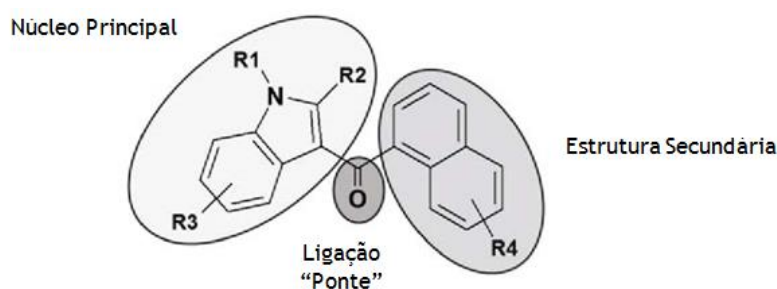


Figura 7 - Estrutura de CS. Estrutura global de CS (adaptado de Le Boisselier *et al.*, 2017)

Apesar de todos os benefícios comprovados até ao momento, os CS apresentam efeitos adversos em humanos como náuseas, falta de ar ou respiração deprimida, hipertensão, taquicardia, dor torácica, espasmos musculares, insuficiência renal aguda, ansiedade, agitação, psicose e comprometimento cognitivo (Castaneto *et al.*, 2014). Apesar de todas estas contra-indicações, é evidente a oferta de um elevado potencial terapêutico (Le Boisselier *et al.*, 2017), que está a ser estudado.

2.3.3.1 Win 55 212-2

Win 55 212-2 (Win) é um potente agonista sintético não seletivo dos recetores de canabinóides (Ellert-Miklaszewska *et al.*, 2005). Nos anos 90 do século XX, aminoalquilindóis, como Win foram investigados com fins farmacoterapêuticos potencialmente mais seguros, por não serem psicotrópicos (Castaneto *et al.*, 2014).

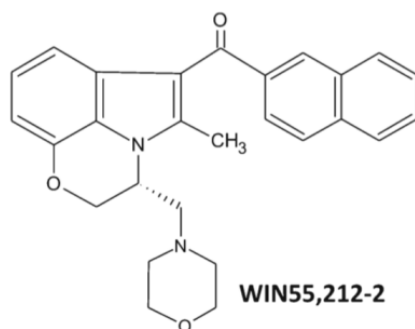


Figura 8 – Estrutura do Win. Estrutura química do Win 55 212-2 (adaptado de Baranska J., 2013)

Os canabinóides estão envolvidos no controle de algumas vias de proliferação e sobrevivência celular tais como: cinase regulada por sinal extracelular (ERK), c-Jun N-terminal cinase (JNK), MAPK, PI3K, cinase de adesão focal e via das ceramidas (Velasco *et al.*, 2005). O Win em particular tem a capacidade de suprimir o crescimento de células de glioma de rato (Massi *et al.*, 2004), regular negativamente as vias de sinalização Akt e ERK, desencadear sinais de apoptose e reduzir a viabilidade celular, bloqueando a progressão do ciclo celular em GBM (Ellert-Miklaszewska *et al.*, 2005; McAllister *et al.*, 2005).

De acordo com a dose administrada, este induz morte celular apoptótica das células de glioma, devido à ativação da cascata das caspases, conduzindo ao aparecimento de alterações apoptóticas dos núcleos das células (Ellert-Miklaszewska *et al.*, 2005).

2.4 Ação dos canabinóides no GBM

Os canabinóides têm diversos modos de atuação nos tumores do SNC e exercem, de forma particular, ação anti-tumoral sobre gliomas. Nos gliomas, os canabinóides reduzem a iniciação tumoral *in vivo* em modelos animais inoculados com células tumorais, uma vez que atuam sobre as células estaminais tumorais (CSC) que iniciam a formação de gliomas *in vivo*. Promovem a diferenciação, diminuem a sobrevivência celular, inibem a angiogénese e a proliferação celular (Aguado *et al.*, 2007), induzem a apoptose, a autofagia citotóxica de células tumorais e promovem a regressão tumoral *in vivo* (Dumitru *et al.*, 2018). Estes feitos são produzidos através da modulação de proteínas pro-apoptóticas e fatores de transcrição e regulação de várias vias envolvidas no controlo da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Cadieux *et al.*, 2006; De Jesús *et al.*, 2010; Ellert-Miklaszewska *et al.*, 2005; Massi *et al.*, 2004).

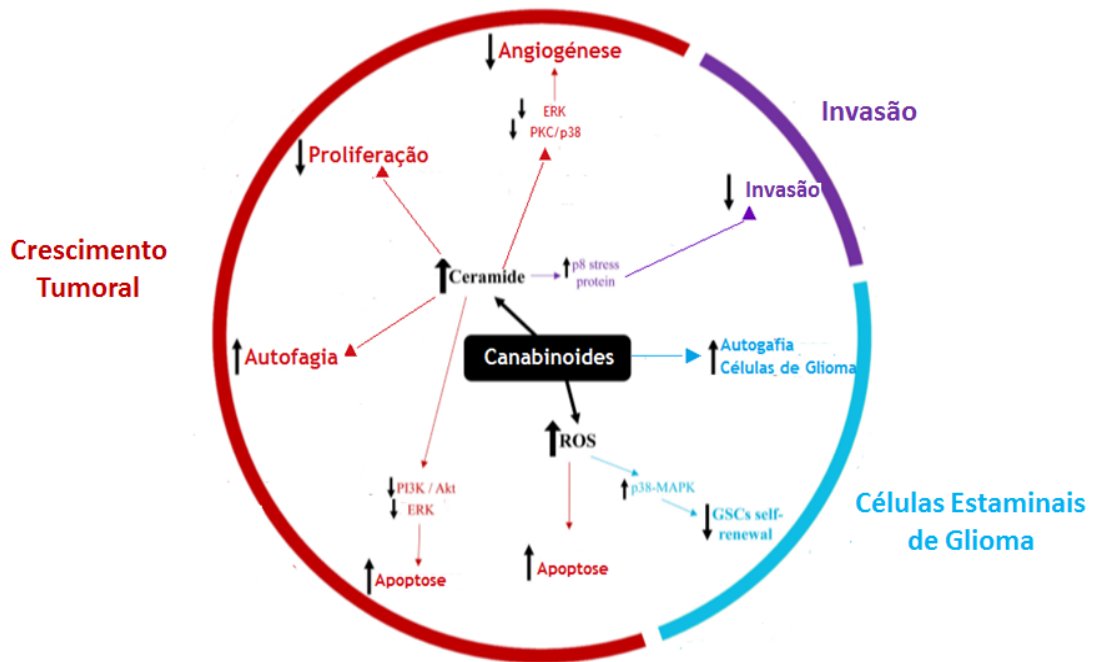


Figura 9 – Modulação de GBM por canabinóides. Resumo dos principais mecanismos moleculares envolvidos na modulação da fisiopatologia do GBM por canabinóides (adaptado de Dumitru *et al.*, 2018)

A ação destes compostos químicos apenas é possível devido à expressão de CB1 e CB2 em células gliais e de glioma (Ivanov and Hei, 2017). Enquanto as células gliais têm expressão aumentada apenas de CB1 (Ceruti and Abbrachio, 2013), as células estaminais derivadas do glioma têm expressão aumentada de ambos os recetores de canabinóides (Aguado *et al.*, 2007). Os níveis de expressão dos recetores de canabinóides nas células estão correlacionados com diversos parâmetros do GBM como

a malignidade e também variam com o envelhecimento. Exemplo disso são dois estudos independentes em que o primeiro demonstrou que a baixa expressão de proteína do recetor CB1 está associada aos tumores de alto grau, tendo-se observado também a diminuição da expressão do recetor CB1 com o envelhecimento (De Jesús *et al.*, 2010); o segundo estudo comprovou que os tumores com alta malignidade têm elevada expressão do recetor CB2 (Dumitru *et al.*, 2018).

A transformação maligna em vários cancros, particularmente em gliomas, está associada a um desequilíbrio no sistema ECS entre os níveis de ligandos endógenos e os recetores, uma vez que ECS regula vários processos fisiológicos, entre os quais funções neuro-específicas através do recetor CB1 (Anjum *et al.*, 2017; Mouro *et al.*, 2019).

O glioma em estudo neste trabalho é o GBM que apresenta propriedades específicas e dificuldades de terapêuticas eficazes disponíveis, fazendo com que diferentes grupos de investigação se dedicassem ao estudo de metodologias alternativas para contrariar as estatísticas sobre a incidência e morte por GBM (Cadieux *et al.*, 2006).

Estudos recentes demonstram que à semelhança dos gliomas em geral, também no GBM, os canabinóides ativam os recetores CB1 e CB2 (De Jesús *et al.*, 2010) provocando efeitos anti-tumorais, anti - proliferativos, pró-apoptóticos, inibindo a angiogénese e proliferação celular e induzindo a paragem do ciclo celular (Aguado *et al.*, 2007; Ceruti and Abbrachio, 2013; Burnstock, 2013; Dumitru *et al.*, 2018; Velasco *et al.*, 2005). A administração local de canabinóides reduz o crescimento das células derivadas do GBM *in vivo* e *in vitro* (Aguado *et al.*, 2007; McAllister *et al.*, 2005). Por outro lado, os genes dos recetores de canabinóides interagem com diferentes fatores de transcrição implicados na metilação do DNA. A possibilidade de que o recetor CB1 sofra regulação epigenética tem sido sugerida, uma vez que a expressão do mRNA do recetor CB1 encontra-se desregulada em diversas condições patológicas e após a exposição a drogas, de facto o promotor do gene do recetor CB1 encontra-se hipermetilado em alguns tumores (D'Addario *et al.*, 2013). Da mesma forma, a possibilidade da ativação dos recetores dos canabinóides induzirem alterações epigenéticas também tem sido sugerida. Concretamente foi referida um aumento, induzido pelos canabinóides, da metilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) em células estaminais de glioma, associada à diferenciação e redução da proliferação destas células (D'Addario *et al.*, 2013).

A morte celular devido à indução de tratamentos com canabinóides depende da geração e acumulação de ceramidas esfingolípídicas pró-apoptóticas que inibem de forma prolongada a cascata de sinalização Raf 1 - MEK - ERK e modulam as vias de sinalização do crescimento e sobrevivência celular, tal como a paragem do ciclo celular (Ceruti and Abbrachio, 2013).

Os canabinóides estimulam a utilização de glicose, essencial para o metabolismo cerebral, e a produção de corpos cetônicos - em ambos os casos os efeitos são prevenidos por antagonistas do recetor CB1 e precedidos pelo aumento rápido e transitório de ceramidas (segundo mensageiro esfingolípido que desempenha um importante papel de controle do destino celular em diferentes locais do SNC) (Velasco *et al.*, 2005).

A ativação do recetor CB1 desencadeia dois picos de produção de ceramidas nas células de gliomas. O tratamento com o agonista do recetor CB1 provoca uma libertação rápida de ceramidas por hidrólise enzimática da esfingomiéline da membrana celular (Ceruti and Abbrachio, 2013) tanto nos astrócitos como em células de glioma. Este aumento dos níveis de ceramidas induz a apoptose e permite ao ECS regular a quantidade de nutrientes fornecidos nos processos biossintéticos a nível celular (Velasco *et al.*, 2005). O segundo pico de ceramidas ocorre passadas horas/dias após ativação do recetor e depende do aumento da síntese de ceramidas de novo (Ceruti and Abbrachio, 2013).

Tal como demonstrado na figura 10, o efeito pro-apoptótico é difundido pelos canabinóides que protegem as células gliais normais, através de efeitos mediados pelos recetores CB1 e pela via de sobrevivência PI3K (Velasco *et al.*, 2005).

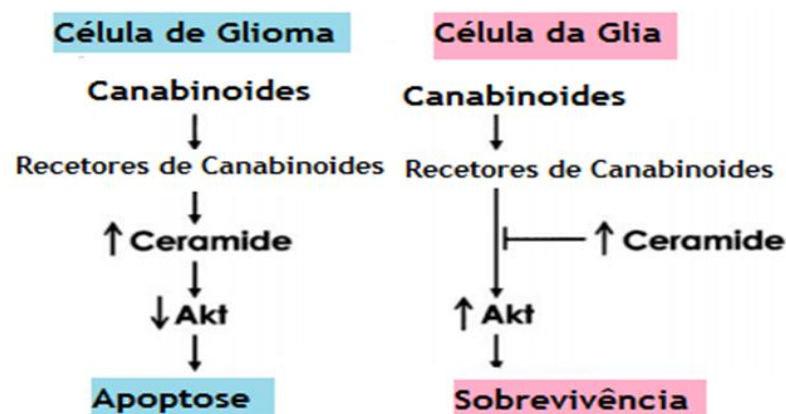


Figura 10 - Efeito dos canabinóides na viabilidade de células gliais e de glioma. Nas células de glioma os canabinóides ativam os seus recetores, induzindo aumento da ceramidas e inibindo a cinase Akt pró-sobrevivência desencadeando a apoptose. Nas células gliais normais a ativação dos recetores de canabinóides previne a inibição da Akt pelas ceramidas o que leva à sobrevivência celular. (adaptado de Velasco G. *et al.*, 2005)

Atualmente são muitos os grupos de investigação que se propõem a recorrer aos agonistas de canabinóides como agente anticancerígeno (Burnstock, 2013), à modulação do ECS (De Jesús *et al.*, 2010), compreensão da sinalização (Aguado *et al.*, 2007) e recurso à terapia epigenética aplicada aos endocanabinóides (Daniele *et al.*, 2014) para fins terapêuticos.

Investigadores descreveram a morte celular programada após o tratamento com o agonista sintético de canabinóides (Win 55 212-2) e demonstraram que THC inibe o crescimento da célula de glioma de rato *in vivo*. A Bad, proteína pro-apoptótica, é fosforilada em resposta a tratamentos com canabinóides, provocando a despolarização mitocondrial e a ativação da cascata de caspases (Ellert-Miklaszewska *et al.*, 2005), uma resposta à ativação da via intrínseca de apoptose (Dumitru *et al.*, 2018).

3 Adenosina

3.1 Estrutura e síntese da adenosina

A adenosina (Ado) é um nucleosídeo endógeno de purina (Ghiringhelli *et al.*, 2012) composto por uma adenina ligada a uma pentose (ribofuranose) por uma ligação β -N9-glicosídica. O nome químico da Ado é 6-amino-9- β -D ribofuranosil-9-H-adenina e a fórmula química é $C_{10}H_{13}N_5O_4$, (Valdés *et al.*, 2018).

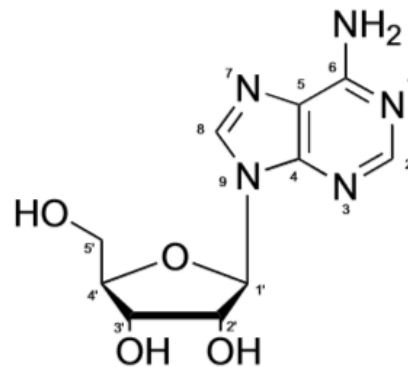


Figura 11 – Estrutura química da adenosina (adaptado de Valdés F., *et al* 2017).

Intracelularmente a Ado pode ser sintetizada por duas reações: por hidrólise do 5'-monofosfato de adenosina (AMP) catalisada pela 5'-nucleotidase, ou por hidrólise da S-adenosil-homocisteína (SAH) catalisada pela hidrolase da SAH (Boison *et al.*, 2002; Phillis and Wu, 1981) como ilustrado na figura 12.

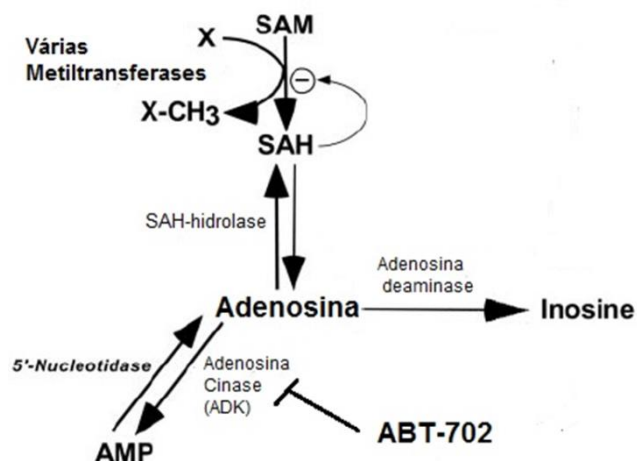


Figura 12 - Esquema do Metabolismo Intracelular da ADO (adaptado de (Boison D., *et al* 2002))

A Ado pode também formar-se extracelularmente pela hidrólise enzimática do ATP extracelular pela ação sequencial das ectonucleotidases CD39 e CD73 e depois entrar na célula através dos transportadores de nucleósidos (Phillis and Wu, 1981). A figura 13 apresenta o metabolismo intracelular e extracelular da Ado. A Ado pode ser consumida por fosforilação a AMP por ação da cinase da adenosina (ADK) ou convertida em inosina pela ação da desaminase da adenosina (ADA) (Valdés *et al.*, 2018). A ADK pode ser inibida através do ABT-702 (ABT) o qual permite manter os níveis de Ado intracelulares elevados, uma vez que bloqueia a atividade da ADK e evita a rápida metabolização da Ado (Boisin D. *et al.*, 2002).

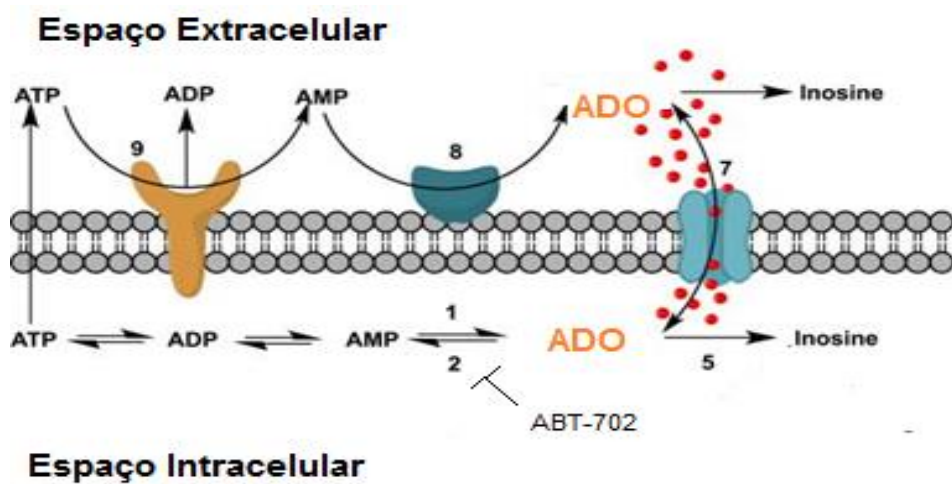


Figura 13 – Representação Esquemática do metabolismo da ADO (adaptado de Valdés F.Z. *et al.*, 2018). 1- 5'-nucleotidase, 2- ADK, 5- ADA, 7- transportador de nucleósidos, 8- ecto-5'-nucleotidase (CD73), 9- CD39.

3.2 Recetores de adenosina

Em 1978, Burnstock demonstrou a existência de duas classes de recetores purinérgicos: P1 (Ado) e P2 (ATP e ADP) (Valdés *et al.*, 2018). Estudos posteriores, identificaram quatro tipos de recetores P1 da Ado denominados por: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Ceruti and Abbrachio, 2013). Estes estão acoplados à proteína G, e medeiam a maioria das funções fisiológicas da Ado (Uribe *et al.*, 2017).

Os recetores A₁ e A₃ estão acoplados à proteína G_{i/o}, regulando negativamente a atividade da ciclase do adenililo. Estes dois tipos de recetores induzem a diminuição do cAMP intracelular, a ativação da PI3K e da cinase C de proteína (PKC). O recetor A₁, em particular, exerce atividade pró-sobrevivência e antiapoptótica. Por outro lado os recetores A_{2A} e A_{2B} induzem a ativação da ciclase do adenililo, resultando no aumento dos níveis intracelulares de cAMP. O A_{2A} está ainda envolvido na regulação da angiogénese, promoção da sobrevivência e proliferação celular endotelial (Ceruti and Abbrachio, 2013; Ghiringhelli *et al.*, 2012).

Os recetores de Ado apresentam diferentes afinidades para o ligando, enquanto os recetores A₁ e A_{2A} tem uma elevada afinidade para a Ado, o que faz com que haja a possibilidade de ativação com baixas concentrações fisiológicas de Ado (na faixa dos nanomolar); os recetores A_{2B} e A₃ só conseguem ativação com elevadas concentrações de Ado (na faixa dos micromolar), sendo ativados em condições patológicas (Ceruti and Abbrachio, 2013; Uribe *et al.*, 2017), tal como no ambiente tumoral (Ghiringhelli *et al.*, 2012).

Os níveis de O₂ influenciam a expressão dos recetores de Ado, fazendo com que na presença de baixos níveis de O₂ a expressão do recetor A_{1A} diminua, ao contrário da expressão de A_{2A} que sofre um aumento (Uribe *et al.*, 2017).

Além dos efeitos mediados por ativação dos seus recetores, a Ado pode também promover modificações epigenéticas, independentemente da ativação dos recetores, quando atinge elevadas concentrações, como consequência da inversão do sentido da reação catalisada pela hidrolase da SAH, a qual catalisa uma reação reversível, e consequente aumento da concentração de SAH, o qual inibe a atividade das metiltransferases dependentes da S-adenosilmetionina (SAM) conduzindo assim a uma hipometilação do DNA (Boison *et al.*, 2002; Williams-Karnesky *et al.*, 2013) (ver figura 12).

3.3 Uso da adenosina na terapêutica

De entre os marcos históricos da utilização de Ado em estudos terapêuticos (ver Valdés *et al* 2018 para revisão), destaca-se o trabalho de Drury e Szent-Gyorgyis (Drury and Szent-Gyorgyis, 1929), que remota a 1929, quando utilizaram pela primeira vez Ado e demonstraram os efeitos que esta tem no sistema cardiovascular e trato gastrointestinal (Drury and Szent-Gyorgyis, 1929; Ribeiro *et al.*, 2016). Uma década depois Lindner e Ridger, em 1939 (como descrito por Valdés *et al.*, 2018) revelaram que Ado é essencial para a regulação do líquido cefalorraquidiano e em 1970, Sattin e Rall (de acordo com Valdés *et al.*, 2018) provaram que esta molécula induz o aumento na concentração de cAMP no cérebro de mamíferos.

Atualmente, a Ado, é objeto de estudo em diversas áreas da investigação, apresentando inúmeros propriedades e possibilitando a sua utilização para os mais variados fins (Valdés *et al.*, 2018). No sistema nervoso, a Ado desempenha diversas funções, nomeadamente atua como um anticonvulsivante endógeno no cérebro via ativação dos recetores A₁ pré e pós sinápticos, diminuindo a excitabilidade neural (Williams-Karnesky *et al.*, 2013); atua como neuromodelador, regulador do crescimento celular (Ceruti and Abbrachio, 2013; Phillis and Wu, 1981), imunossupressor (Torres *et al.*, 2016), imunomodulador, neuroprotetor, desempenhando um importante papel na sobrevivência e morte celular (Uribe *et al.*, 2017).

A Ado está presente no meio extracelular, em concentrações baixas (Ghiringhelli *et al.*, 2012). Em situações de *stress* metabólico, como em ambiente tumoral e períodos de isquémia, as concentrações aumentam. No cérebro tem um papel essencial no metabolismo energético. A sobrevivência e as funções celulares podem ser influenciadas quer pelas concentrações intra quer extracelulares de Ado (Ceruti and Abbrachio, 2013; Phillis and Wu, 1981).

3.4 Ação da adenosina no GBM

As purinas estão presentes em todos os tipos de células e são produzidas por diversas vias (Mutafova-Yambolieva and Durnin, 2014). No caso das células de tumores cerebrais há a ativação da síntese de novo de purinas de forma a manter a capacidade de auto-renovação, proliferação e formação de tumores. A Akt regula positivamente o metabolismo da glicose, proteínas, lípidos e também da síntese de purinas pela via PI3K/Akt. Uma elevada expressão das enzimas da síntese das purinas correlaciona-se com um mau prognóstico em pacientes com GBM, por isso a inibição da síntese de purinas e da via PI3K/Akt é utilizada como um potencial alvo terapêutico (Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2017).

No ambiente tumoral de hipoxia, nas áreas internas do tumor verifica-se que a concentração de Ado está aumentada, podendo atingir concentrações da ordem dos micromolar, o que possibilita a estimulação dos 4 subtipos de recetores de Ado (Daniele *et al.*, 2014).

De facto, o aumento da produção de Ado foi recentemente descrito em células GBM submetidas à hipóxia (Torres *et al.*, 2019).

A Ado mostrou promover a migração e invasão celular e aumentou a expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquima, por meio da ativação dos recetores A₃ (Gessi *et al.* 2010; Torres *et al.* 2019) e A_{2B} (Yan *et al.* 2019) da Ado. O aumento da expressão de proteínas transportadoras de resistência a multidrogas por ativação de A₃ (Quezada *et al.* 2013) e A_{2B} (Yan *et al.* 2019) também foi descrito em GBM. Por outro lado, o bloqueio de recetores A_{2B} aumentou significativamente a morte celular induzida pelo TMZ em GBM (Yan *et al.* 2019).

Ações mediadas por recetores de Ado na proliferação celular em GBM também foram descritas anteriormente, mas os resultados são contraditórios. Nas células estaminais tumorais de glioblastoma (CSC), a ativação dos recetores de Ado A₁ e A_{2B} diminuiu a proliferação e induziu a apoptose, enquanto nas linhas de células de GBM não-CSC a proliferação foi aumentada pela ativação dos recetores da Ado A₁, A_{2B} ou A₃ (Daniele *et al.* 2014 Rathbone *et al.*, 1992). Por outro lado, Liu *et al.* 2014 refeririam uma ação pró-proliferativa de Ado, mediada pela ativação do recetor A_{2B}, nas CSC de GBM submetidas a hipóxia.

Os estudos acima referidos demonstraram que todos os recetores de Ado são potenciais alvos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Valdés *et al.*, 2018).

4 Objetivo

O GBM é o tumor cerebral mais comum e agressivo em adultos. Os canabinóides, compostos derivados da *Cannabis sativa L.*, mostraram produzir efeito anti-tumoral em GBM, via ativação de recetores CB1 dos canabinóides. A expressão do gene dos recetores CB1 mostrou estar reduzida em alguns tipos de cancro como consequência da hipermetilação da região promotora deste gene (D'Addario *et al.*, 2013). Por outro lado, algumas ações anti-tumorais dos recetores CB1 em glioma envolvem alterações epigenéticas, nomeadamente metilação das histonas (D'Addario *et al.*, 2013). Regiões de hipoxia são encontradas em vários tipos de cancros tais como o GBM, estando associadas ao crescimento e progressão tumoral. A Ado é gerada durante os episódios de hipoxia e pode induzir hipometilação do DNA, ao interferir com a ação das metiltransferases dependentes de SAM (Boison *et al.*, 2002). Desconhece-se se os elevados níveis de Ado encontrados em GBM, os quais podem induzir alterações epigenéticas, poderão interferir com a expressão ou a ação anti-tumoral dos canabinóides.

O objetivo do presente trabalho consiste em investigar se o aumento dos níveis de Ado afeta a expressão do recetor CB1 e o efeito anti-proliferativo e citotóxico dos canabinóides em cultura de linhas celulares de GBM comparativamente a astrócitos humanos normais. A expressão dos recetores CB1 será avaliada por RT-PCR e o efeito anti-proliferativo e citotóxico dos canabinóides será estudado avaliando a viabilidade celular pelo método do MTT e a apoptose por quantificação da libertação da desidrogenase do lactato.

Capítulo B

Materiais e Métodos

1 Fármacos e reagentes

Os fármacos (*R*)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone mesylate (WIN 55 212-2), 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), 2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine (SCH 58261), *N*-[2-(2-Furanyl)-8-propyl-8H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-yl]-*N'*-(4-methoxyphenyl)urea (MRE 3008F20), *N*-(4-Cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl)phenoxy]acetamide (MRS 1754) e 4-Amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidine (ABT 702) foram adquiridos à Tocris (*Bristol, UK*). A Ado, gentamicina e o reagente TRI foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

2 Linhas celulares

No desenvolvimento deste estudo foram utilizadas três linhas celulares humanas derivadas de GBM (U373, U87 e SNB19), como modelos *in vitro*, e culturas primárias de astrócitos humanos (HA). Os HA foram adquiridos à ScienCell. As linhas celulares de GBM humanas U373 e U87, foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Joseph Costello (Universidade da Califórnia, San Francisco), e a linha SNB19, foi obtida da Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas de Células.

O recurso a três tipos de linhas de GBM distintas deve-se às diferenças morfológicas e comportamentais que as mesmas apresentam, permitindo avaliar a resposta de cada uma das drogas/compostos em estudo. O uso de células normais – os HA – tem como finalidade comparar o comportamento e reação das células não transformadas com as células de GBM, ambas expostas aos mesmos compostos/drogas. Todas as linhas sofreram alterações genéticas que proporcionaram vantagens proliferativas, comparativamente com as células originais.

2.1 Linha celular U373

A linha celular U373-MG (U373) é uma linha celular humana, derivada de GBM humano. Foi isolada pela técnica de explante no laboratório de Uppsala, a partir de um astrocitoma de grau IV.

São células mesenquimais, morfológicamente semelhante a astrócitos – pleomórficas. Têm elevada capacidade de aderência às superfícies, uma alta taxa de proliferação, de desenvolvimento e o seu crescimento ocorre em monocamada (Motaln *et al.*, 2015).

2.2 Linha celular U87

A linha celular U87-MG (U87) derivada de GBM humano foi obtida em 1966 na Universidade de Uppsala, a partir de uma paciente do sexo feminino, com 44 anos de idade, pela técnica de explante. Possui a capacidade de produzir tumor maligno consistente com GBM quando inoculada em ratinhos.

Apresenta morfologia epitelial, semelhante a células neuronais (Motaln *et al.*, 2015), cresce em monocamada com moderada taxa de proliferação e auto-renovação. São multipotentes, Pleomórficas e com núcleos hipercromáticos (Urbańska and Mandal, 2014).

Das três linhas em estudo é a que apresenta um crescimento mais demorado.

2.3 Linha celular SNB19

A linha celular SNB19 deriva do GBM humano e caracteriza-se por uma dimensão reduzida, conseguindo crescer em distintos tipos de meio, não necessitando obrigatoriamente da presença de CO₂.

Distingue-se por ter mantido as mesmas características ao longo de treze anos, permitindo fazer mais de 200 passagens. Têm uma taxa de proliferação intermédia e produzem fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e fator de crescimento do entotélio vascular (VEGF) (Welch *et al.*, 1995).

Tem a capacidade de induzir tumores em ratinhos (indistinguíveis de tumores originais). Apresenta valores elevados de proteases, padrão cromossômico complexo, heterogeneidade celular, são neoplásicas e tem capacidade para responder a agentes de diferenciação (Welch *et al.*, 1995).

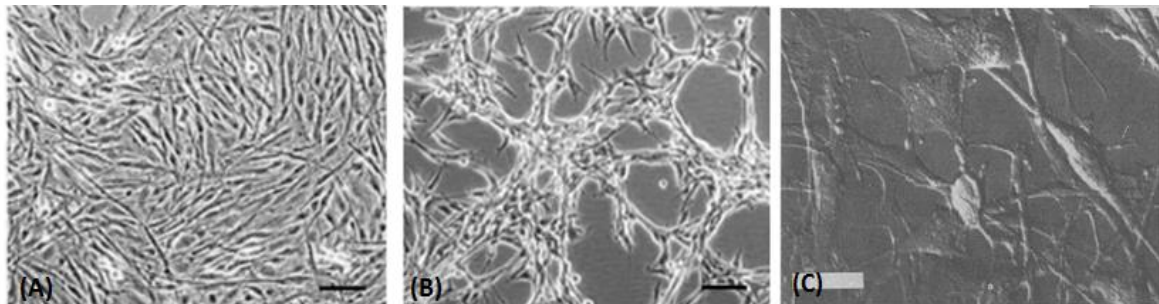


Figura 14 – Morfologia das linhas celulares de GBM em cultura. Imagens representativas da morfologia das linhas celulares de GBM (A) U373 (adaptado de Motaln *et al.*, 2015), (B) U87 (adaptado de Motaln *et al.*, 2015) e (C) SNB 19 (adaptado Welch W.C. *et al.*, 1995)

2.4 Cultura celular

As três linhas celulares de GBM utilizadas foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Biowest), com glutamina estável, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Biochrom), 1% de antibiótico *Gentamicin* (50mg/mL, Sigma-Aldrich) num frasco de cultura e mantidas numa incubadora (AutoFlow DHD CO₂ Air-Jacketed Incubator; NuAire, EUA) a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂ e 95% Ar.

As linhas celulares U373, U87 e SNB19 possuem as mesmas condições de cultura, nomeadamente números de passagens (de P3 a P6).

As células primárias de HA foram semeadas em frascos revestidos com poli-L-lisina (1mg/mL; ScienCell) e mantidas em meio de cultura suplementada em *Astrocyte Medium* (AM, ScienCell) suplementado com 2% de FBS, 1% de suplemento de crescimento de astrócitos (AGS), 1% de solução de penicilina/estreptomicina (P/S) e incubadas numa incubadora (AutoFlow DHD CO₂ Air-Jacketed Incubator; NuAire, EUA) a 37°C com uma atmosfera de 5% CO₂ e 95% Ar. Todos os reagentes utilizados no meio de cultura foram adquiridos à ScienCell.

2.4.1 Passagem de células

As linhas celulares foram expandidas em monocamada nos *t-Flask* sendo-lhe sempre renovado o meio 24 horas após o semeio, continuando a crescer até atingirem uma confluência entre os 80 a 90%.

Todas as linhas celulares usadas são aderentes, sendo necessário tripsinizá-las. Para tal, foi removido todo o meio de cultura do *t-Flask* e foi lavado com tampão *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS; Sigma-Aldrich). O DPBS foi aspirado e foi adicionado ao frasco solução de tripsina-EDTA (0,25%) num volume suficiente para cobrir a superfície. O frasco foi colocado a 37°C, durante aproximadamente 5 minutos para ocorrer a reação de tripsinização. Após o descolamento das células adicionou-se meio de cultura com FBS, de forma a parar a reação enzimática. As células foram recolhidas para um tubo *falcon* e centrifugadas a 1000 rotações por minutos (rpm) durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* de células foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura.

2.4.2 Contagem de células

A contagem celular foi efetuada recolhendo 10 µL da ressuspensão celular à qual se adicionou igual volume de Azul de Tripano (ScienCell) e homogeneizou-se. Da mistura foram retirados 10 µL para contagem de células viáveis numa câmara de Neubauer. Posteriormente à contagem dos quatro quadrantes foi estimado o número de células por mL e o número total de células no frasco de cultura, através das fórmulas seguintes:

$$\frac{\text{células}}{\text{cm}^2} = \frac{(\text{Soma dos quadrantes})}{4} \times \text{fator diluição} \times \left(\frac{1}{\text{volume do quadrante (mL)}}\right)(10^4)$$

$$\text{N}^\circ \text{ Total Células} = \text{N}^\circ \text{ Células/mL} \times V \text{ ressuspensão celular (1mL)}$$

2.4.3 Densidades celulares

Os diferentes tipos de células foram semeados com diferentes densidades, uma vez que as células crescem a velocidades distintas assegurando que no fim dos ensaios experimentais há aproximadamente o mesmo número de células independentemente do tipo celular utilizado.

As U373 foram semeadas com uma densidade de 1800 células/cm², as U87 tal como os HA foram semeados à densidade de 6500 células/cm² e as SNB19 com 4800 células/cm².

3 Viabilidade celular (MTT)

3.1 Determinação do EC₅₀ do Win nas linhas de GBM e HA

Os três tipos de células (U373, U87e SNB19) foram semeadas em placas de 96 poços, 48 horas antes do início do ensaio, e 24 horas depois do semeio foi renovado o meio de cultura. O ensaio iniciou-se ao tempo zero (t= 0 horas) e teve uma duração total de 72 horas, tempo durante o qual foi estudado um intervalo de concentrações de Win entre os 0,1 μM a 30 μM (para as 3 linhas celulares), em que 8 condições distintas foram analisadas (em sextuplicados), tal como demonstrado na figura 15: condição 1 (meio de cultura), condição 2 (células + meio), condição 3 (veículo/controlo), condição 4 (Win 0,1 μM), condição 5 (Win 1 μM), condição 6 (Win 5 μM), condição 7 (Win 15 μM) e condição 8 (Win 30 μM). Estas condições permitiram analisar a resposta das células às diferentes concentrações de Win. Este ensaio foi repetido 8 vezes (n=8) de forma a garantir a reprodutibilidade dos resultados, neste caso, do efeito do Win nas diferentes concentrações testadas.

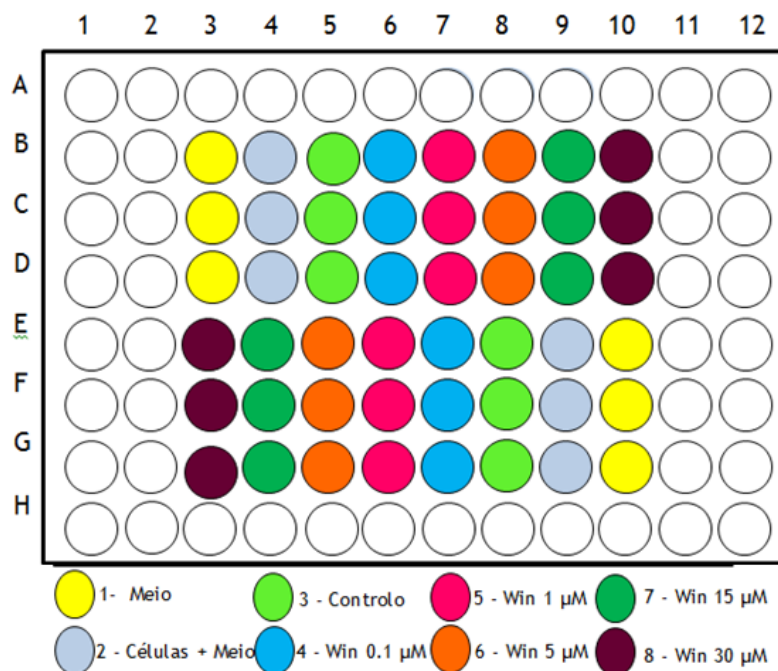


Figura 15 – Ensaio com concentrações de Win de 0,1 μM a 30 μM , para linhas de GB. Representação Esquemática da placa de 96 poços com as 8 condições para avaliação da viabilidade celular.

No caso dos HA, estudou-se o intervalo de concentrações de Win 0,1 μM a 5 μM , onde se analisaram 6 condições distintas, tal como demonstrado na figura 16.

De forma análoga ao que foi feito para as linhas celulares, como descrito anteriormente, os HA foram semeados em placas de 96 poços, previamente revestidas com polilisina.

O ensaio decorreu em condições similares ao ensaio das linhas (iniciou-se ao tempo de 0 horas e teve a duração de 72 horas). As condições deste ensaio são: condição 1 (Meio), condição 2 (células + meio), condição 3 (Veículo/Controlo), condição 4 (Win 0,1 μM), condição 5 (Win 1 μM) e condição 6 (Win 5 μM), que permitiram avaliar a resposta dos HA às diferentes concentrações de Win. O ensaio foi repetido 6 vezes (n=6) para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

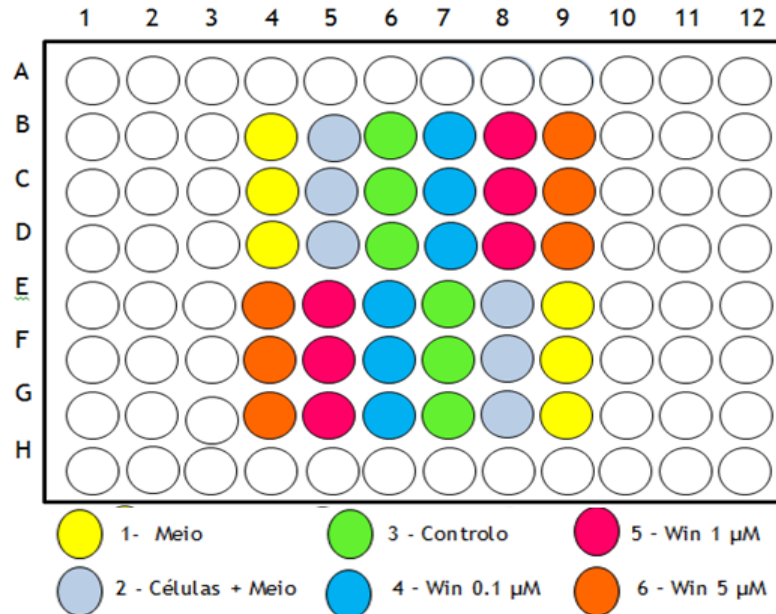


Figura 16 – Ensaio com concentrações de Win de 0.1 μM a 5 μM , para HA. Representação Esquemática da placa de 96 poços com as 6 condições para avaliação da viabilidade celular.

Usou-se o ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para analisar a viabilidade /proliferação celular das linhas de GBM (U373, U87 e SNB19) e de HA para determinação do EC_{50} .

Foi preparada a solução de MTT, com a concentração de 5 mg/mL em DPBS, isolado da luz. No final das 72 horas dos ensaios (para todas as linhas e HA) removeu-se o meio de cultura e adicionou-se meio de cultura novo. Em seguida, na ausência de luz, adicionaram-se 10 μL da solução de MTT (5 mg/mL), colocou-se a placa na incubadora a 37°C até formação de cristais púrpura (nunca ultrapassando as 4h de incubação). Em seguida, retirou-se o meio e a solução de MTT e dissolveram-se os cristais em 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). A placa ficou em agitação contínua para garantir a dissolução total dos cristais. Sempre que possível, a técnica foi feita na ausência de luz e com a placa protegida com papel de alumínio.

No final leram-se as absorvências a 570 nm, num espetófolotmetro para microplacas (BioRad), onde o ensaio 1 (meio de cultura completo) foi utilizado como branco.

3.2 Determinação do efeito do Win na ausência ou na presença de Ado/ABT e na ausência ou na presença de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado, nas linhas de GBM e HA

De forma semelhante ao descrito anteriormente, na secção 3.1 deste capítulo, as células das linhas de GBM (U373, U87 e SNB19) e HA foram semeados em placas de 96 poços. De forma similar, durante 72 horas, as células foram incubadas com Win 5 μM , na ausência ou na presença de Ado/ABT e na ausência ou na presença de *cocktail* de antagonistas dos recetores de Ado (C.A.). O C.A. é constituído por uma mistura de dipropilciclopentilxantina (DPCPX) (15 μM) antagonista seletivo do recetor A_1 , 5-Amino-7-(2-phenylethyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo(4,3-e)-1,2,4-triazolo(1,5-c)pyrimidine (SCH58261) (10 μM) antagonista seletivo do recetor A_{2A} , [^3H]5N-(4-methoxyphenylcarbonyl)amino-8-propyl-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine (MRE 3008F20) (1,5 μM) antagonista do recetor A_3 e 3-propyl-6-ethyl-5[(ethylthio)carbonyl]-2-phenyl-4-propyl-3-pyridine-carboxylate (MRS 1754) (0,1 μM) antagonista do recetor A_{2B} . Foram analisados sextuplicados de 9 condições (figura 17): condição 1 (Meio), condição 2 (células + meio), condição 3 (Veículo/Controlo); condição 4 (Ado 30 μM /ABT 15 μM); condição 5 (Win 5 μM); condição 6 (C.A.), condição 7 (C.A.+Ado/ABT); condição 8 (C.A.+Win 5 μM) e condição 9 (C.A.+Win 5 μM +Ado/ABT).



Figura 17 – Ensaio para concentração de Win 5 μM , na presença ou ausência de C.A. e na presença ou ausência de Ado/ABT. Representação Esquemática da placa de 96 poços com as 9 condições para avaliação da viabilidade celular.

Neste trabalho foram realizados dois conjuntos de experiências distintos: um com Ado e outro com ABT. A Ado é rapidamente metabolizada e para manter a sua concentração elevada é necessário recorrer a alternativas. Para isso foram analisadas duas metodologias distintas, a primeira consistiu no reforço de Ado a 30 μM de 8 horas em 8 horas (às 7 horas \rightarrow 15 horas \rightarrow 23 horas de cada dia de incubação) no decorrer das 72 horas do ensaio, fazendo com que a administração de Ado mantivesse os altos níveis de concentração. A outra metodologia tinha como finalidade bloquear a ADK (enzima que promove a conversão de Ado em AMP) através da incubação com ABT, um inibidor da ADK, fazendo com que os níveis de Ado intracelular se mantivessem elevados. O ensaio teve a duração de 72h. Realizaram-se 4 ensaios independentes ($n=4$), para cada uma das metodologias (Ado ou ABT) de forma randomizada para assegurar a reprodutibilidade do ensaio.

No final das 72 horas de ensaio usou-se o método do MTT, de forma similar ao descrito na secção 3.1 deste capítulo, para avaliar a viabilidade/proliferação celular.

4 Avaliação da citotoxicidade celular (LDH)

O ensaio da libertação da Desidrogenase do lactato (LDH) avaliou a citotoxicidade dos compostos/drogas aplicados às células de GBM (U373, U87 e SNB19) e HA. Para a realização do ensaio de LDH retirou-se 25 µL de meio de cultura de cada replicado dos ensaios de 3.1 e numa nova placa de 96 poços juntou-se os replicados dois a dois (ex.:1.1+1.2;1.3+1.4;1.5+1.6). Realizou-se ainda um controlo positivo que consistiu na diluição de 1 µL de *LDH Positive Control* dissolvido em 10 mL de Albumina sérica bovina (BSA) 1% em DPBS.

Neste estudo recorreu-se ao *Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) e de acordo com as recomendações do fabricante adicionaram-se aos 50 µL de amostra, 50 µL de *Reaction Mix* (diluição de *Substrate Mix* liofilizado em 11,4 mL de DPBS, ao qual se adicionou 0,6 mL de *Assay Buffer*). Incubou-se a placa durante 1 hora à temperatura ambiente, na ausência de luz e com agitação contínua, e no final adicionou-se a cada poço 50 µL da solução *STOP* homogeneizando bem a mistura.

No final leu-se as absorvências a 490 nm e 680 nm num espetótopmetro para microplacas (BioRad). Após descontar a absorvência obtida a 680 nm à obtida a 490 nm, o valor obtido foi convertido em unidades de atividade de LDH libertadas, recorrendo a uma curva de calibração, e o resultado expresso em µUnidades por 1000 células.

5 Ensaios para a extração de RNA total

As células (U373, U87 e SNB19) foram semeadas em placas de 6 poços, e de forma semelhante ao descrito anteriormente, procedeu-se a um ensaio de 72 horas de duração. Foram usadas 3 condições distintas, cada uma efetuada em quadruplicado: condição 1 (Veículo/Controlo), condição 2 (Ado 30 μ M) e condição 3 (ABT 15 μ M). Neste ensaio foi necessário fazer o reforço de Ado 30 μ M, de 8 horas em 8 horas (7 horas \rightarrow 15 horas \rightarrow 23 horas), na condição 2, para manter as concentrações de Ado elevadas. Realizaram-se 3 ensaios independentes (n=3) de forma randomizada para assegurar a reprodutibilidade do ensaio.

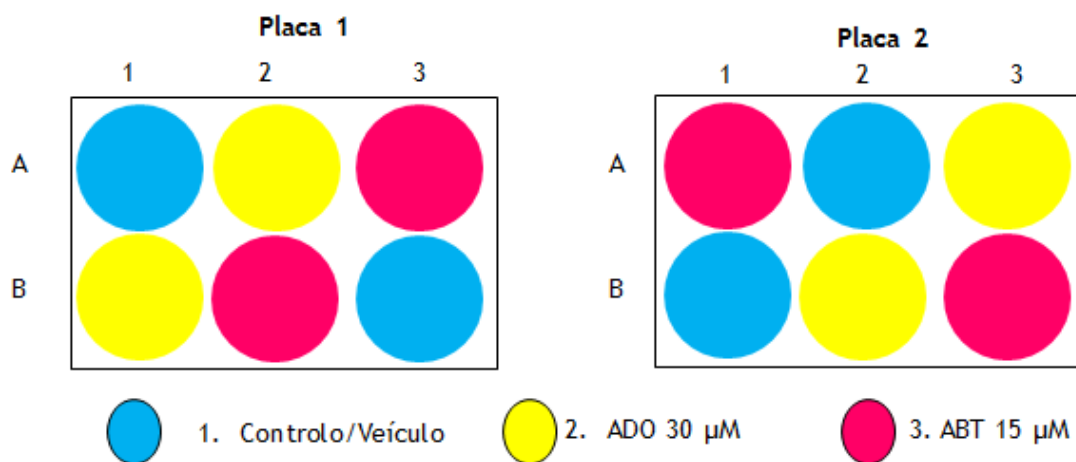


Figura 18 – Ensaio para recolha de RNA. Esquema das placas de 6 poços para recolha de RNA das condições de Controlo, Ado 30 μ M e ABT 15 μ M.

No final das 72 horas as células foram tripsinizadas, recolhidas e centrifugadas durante 2 minutos à velocidade máxima, procedeu-se à congelação imediata em azoto líquido e posterior armazenamento a -80°C .

Foi feita a extração de RNA total a partir das células das linhas celulares de GBM (U373, U87 e SNB19), anteriormente congeladas. Todo o protocolo foi realizado em gelo (devido à sensibilidade térmica do RNA), com recurso a fortes agentes desnaturantes e com água tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC), para inativar as Ribonucleases (RNases).

5.1 Extração de RNA total

No protocolo para extração de RNA total utilizou-se *Tri-Reagent* (Tri) (Sigma-Aldrich), uma mistura de tiocianato de guanidina e fenol em solução monofásica. De acordo com as recomendações do fabricante, adicionou-se 200 µL de Tri a cada microtubo com as células (1 mL de Tri/100 mg de células), homogeneizou-se no vortex (para dissociar os complexos nucleoprotéicos), tendo as amostras permanecido por 10 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, adicionaram-se 40µL de clorofórmio (200 µL de clorofórmio/1 mL de Tri) e agitou-se vigorosamente durante 15 segundos, tendo ficado por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente centrifugou-se a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, de onde se obteve a separação em três fases: fase aquosa (transparente) – RNA; interfase (esbranquiçada) – DNA e fase orgânica/*pellet* (rosa) – proteínas, resíduos de fenol e clorofórmio.

De forma muito cuidadosa, para não arrastar porções das outras fases, transferiu-se a fase aquosa (RNA) para um microtubo novo, devidamente identificado, ao qual se adicionou 100 µL de isopropanol (500 µL/1 mL de Tri) para precipitar o RNA total, formando-se uma névoa, e agitou-se vigorosamente, tendo ficado por 10 minutos à temperatura ambiente. Fez-se uma nova centrifugação a 12000 rpm, por 15 minutos a 4°C, onde se depositou um *pellet* correspondente ao RNA precipitado. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de etanol 75% (dissolvido em água DEPC) e centrifugou-se a 7500 rpm por 10 minutos a 4°C, para remover os resíduos dos reagentes utilizados. No final descartou-se o sobrenadante e reidratou-se o RNA total (*pellet*) em 25 µL água DEPC ficando armazenado no -80°C para posterior análise.

5.2 Avaliação da integridade do RNA total

A integridade do RNA total extraído foi analisada com recurso a separação deste através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) diluído 50 vezes e corado com *GreenSafe* (NZYTech), agente intercalante de ácidos nucleicos (3 μ L *GreenSafe*/100 mL de TAE).

As amostras foram preparadas num microtubo novo onde se adicionou 2 μ L de amostra, com 8 μ L de água DEPC e 1 μ L de *Loading Buffer* 10x (corante de rastreamento para deposição das amostras e acompanhamento da corrida). Em seguida, depositou-se as amostras nos poços do gel, previamente introduzido na tina (BioRad) e ligado à fonte (BioRad) com a potência de 140 V, por aproximadamente 30 minutos.

No final da corrida, com recurso ao Transiluminador (Uvitec), sob a exposição a luz ultravioleta (UV), avaliou-se a integridade do RNA com presença de duas bandas: 18s e 28s (onde a 28s apresenta o dobro da intensidade da 18s).

5.3 Quantificação de RNA total

A quantificação do RNA total realizou-se com recurso a um nanoespectrofotómetro (Nanophotometer™, Implén) que indica de forma direta a concentração de RNA total (ng/ μ L) e a razão A_{260}/A_{280} , que traduz o grau de pureza do RNA total, pela fração entre as absorvências a 260 nm e a 280 nm (idealmente no intervalo de 1,8 a 2,1). As medições foram feitas com 3 μ L de amostra e previamente fez-se um controlo/branco com 3 μ L água DEPC.

5.4 Tratamento do RNA total com DNase

O tratamento com desoxirribonuclease (DNase) é realizado para eliminar vestígios residuais de DNA genómico e efetua-se antes da síntese de DNA complementar (cDNA).

Retirou-se da amostra o volume de RNA correspondente a 1000 ng e completou-se o volume de 8 μ L com água DEPC. Adicionou-se 1 μ L de *Reaction Buffer* (10X) com $MgCl_2$ (Thermo Fisher Scientific) e 1 μ L de *DNase I RNase-free* (Thermo Fisher Scientific) a cada amostra, e incubou-se durante 30 minutos a 37°C num termociclador (Bio-Rad). Em seguida, adicionou-se 1 μ L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (50mM) e fez-se uma nova incubação a 65°C por 10 minutos. Findada a incubação resfriou-se as amostras até 4°C.

6 Síntese de DNA complementar

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA por transcrição reversa, reação catalisada pela enzima transcriptase reversa na presença de *primers*, utilizando um *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific).

De acordo com as recomendações do fabricante adicionou-se a cada amostra de RNA, tratadas com DNase, 1 μL de *Random Hexamer* (Thermo Fisher Scientific) e incubou-se a 65°C por 5 minutos, no termociclador. Em seguida, preparou-se uma mistura (para $n + 1$ reações) com: 4 μL *Reaction Buffer (5x)* (Thermo Fisher Scientific), 1 μL *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/ μL) (Thermo Fisher Scientific), 2 μL de mistura dNTP (10 mM) (Thermo Fisher Scientific), 1 μL *RevertAid M-MuLV RT* (200 U/ μL) (Thermo Fisher Scientific). Por cada amostra adicionaram-se 8 μL da mistura preparada, e incubou-se 5 minutos a 25°C, seguido de 60 minutos a 45°C e 5 minutos a 70°C, finalizou-se a síntese com o arrefecimento até 4°C, armazenando-se o cDNA a -20°C.

7 Desenho de *primers* e PCR convencional

Os *primers* para o recetor CB1 e β -actina foram desenhados no programa informático *National Center for Biotechnology* (NCBI), *Primer-BLAST* e estão descritos na Tabela 2. De forma a garantir que amplificavam enzimaticamente as sequências correspondentes aos mRNA dos genes em estudo, efetuou-se um Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O PCR convencional, técnica de amplificação enzimática, teve por objetivo confirmar a expressão dos genes CB1 e β -actina (*housekeeping*) nas linhas de GBM (U373, U87 e SNB19) e nos HA. Segundo as recomendações do fabricante preparou-se uma mistura (para n + 1 reações) com: 5 μ L *Green Master Mix Speedy* (Thermo Fisher Scientific), 0,4 μ L *primer forward* (10 μ M), 0,4 μ L *primer reverse* (10 μ M) e 3,2 μ L H₂O estéril, por cada reação. Em seguida, adicionou-se 1 μ L de cDNA da amostra correspondente ao tubo correspondente, com exceção dos negativos onde se adicionou 1 μ L de H₂O estéril.

As amostra preparadas foram incubadas num termociclador (Bio-Rad) durante 2 minutos a 95°C, seguindo-se 40 ciclos com: 5 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C e 3 segundos a 72°C. Por fim a última incubação ocorreu a 72°C por 5 minutos, deixando-se as amostras arrefecer até aos 4°C.

Tabela 2 - Sequências dos *primers* dos genes utilizados no estudo

Gene	ID	Tamanho do Fragmento	Temperatura de Annealing	Primer Forward	Primer Reverse
<i>B-actina</i>	NM_001101.5	204 pb	60°C	TTCCTGGGCATGGAGTCCT	AGGAGGAGCAATGATCTTGATC
CB 1	NM_001160226.2	141 pb	60°C	CAGGCCTTCCTACCACTTCAT	ACCCACCCAGTTTGAACAGA

A cada amostra foi adicionado 2 μ L de *Loading Buffer* 10x e os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose a 2%, tal como descrito no secção 5.2 do capítulo B. Num dos poços do gel colocou-se 4 μ L do marcador de peso molecular *NZYDNA Ladder VI* (NZYtech), para confirmar os tamanhos dos genes.

8 PCR em tempo real

A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) teve por objetivo quantificar o cDNA em cada amostra utilizando um corante fluorescente. Inicialmente, para otimização da técnica, foi realizada a curva de eficiência para os genes CB1 e β -actina (*housekeeping* – que tem por função normalizar a expressão do gene CB1), através de diluições seriadas: 1 (stock) – 1:2 – 1:4 – 1:8 – 1:16, em duplicado, para que a eficiência de amplificação produzida pelos *primers* estivesse entre 95% - 105%.

De acordo com as recomendações do fabricante, preparou-se uma mistura (para n + 1 reações) que continha por cada reação: 5 μ L *Syber green (NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x); NZYtech)*, 0,4 μ L *primer forward* (10 μ M), 0,4 μ L *primer reverse* (10 μ M) e 3,2 μ L H₂O estéril. Distribui-se por cada poço da placa 9 μ L da mistura, adicionou-se 1 μ L de cDNA, diluído de 1:3 em H₂O estéril a cada poço com amostra e 1 μ L de H₂O estéril aos poços com o controlo.

Colocou-se a placa no aparelho de PCR (*CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System; Bio-Rad*) por 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por 5 segundos, 60°C por 10 segundos e 72°C por 3 segundos. No final incubou-se 5 minutos a 72°C.

Dos resultados obtidos avaliou-se os perfis das curvas de *melting*, onde foi possível analisar a formação ou não de dímeros e a pureza dos produtos amplificados. Os resultados obtidos do real-time PCR foram analisados usando o método Ct comparativo ($\Delta\Delta$ Ct), que compara os Ct das amostras com os Ct do controlo, sendo estes normalizados pelos Ct obtidos do gene de referência (β -actina).

9 Análise estatística

A análise estatística de todos os resultados obtidos foi realizada no *GraphPad Prism* (versão 8.2.0). Os valores encontram-se expressos em média \pm epm. As comparações entre 2 médias foi efetuada através do teste t de *Student*. As comparações entre médias de 3 ou mais grupos foram feitas pelo teste *One-Away – ANOVA* seguida de teste *post-hoc de Tukey*, utilizando o *GraphPad Prism* (versão 8). Considerou-se, para os testes, resultados significativamente estatísticos quando $P < 0,05$.

Capítulo C

Resultados

1 Avaliação do efeito de um agonista dos recetores dos canabinóides na viabilidade/proliferação celular

A viabilidade celular foi avaliada nas diferentes culturas de linhas de GBM e HA pelo ensaio de MTT tal como descrito na secção de Materiais e Métodos, capítulo B.

1.1 Avaliação do efeito na viabilidade/proliferação celular utilizando um intervalo de concentrações de Win, para linhas de GBM

Começou-se por avaliar a viabilidade/proliferação celular das linhas de GBM quando tratadas com concentrações de Win entre 0,1 μM a 30 μM . Os resultados apresentados nas figuras 19 a 21 correspondem às médias \pm epm, em percentagem relativamente ao ensaio células + meio, das absorvências registadas.

Na figura 19 encontra-se representada a viabilidade/proliferação celular obtida após incubação durante 72h na presença de Win (0,1 μM -30 μM) para a linha U373. Como podemos observar, as concentrações de Win 0,1 μM e de Win 1 μM não produzem redução significativa da viabilidade/proliferação celular, comparativamente ao controlo (veículo). As restantes concentrações estudadas produziram uma redução drástica da proliferação celular, sendo que as concentrações mais elevadas anulam quase por completo a viabilidade/proliferação celular (Win 15 μM – 97,42% e Win 30 μM – 97,54% de redução da viabilidade/proliferação relativamente ao controlo), enquanto o Win 5 μM reduz a proliferação em 88,18%, que apesar de acentuada não é tão severa como nas concentrações superiores. As três últimas condições de estudo (Win 5 μM ; Win 15 μM e Win 30 μM) apresentam redução significativamente estatística em relação à condição Controlo ($P < 0,0001$).

U373

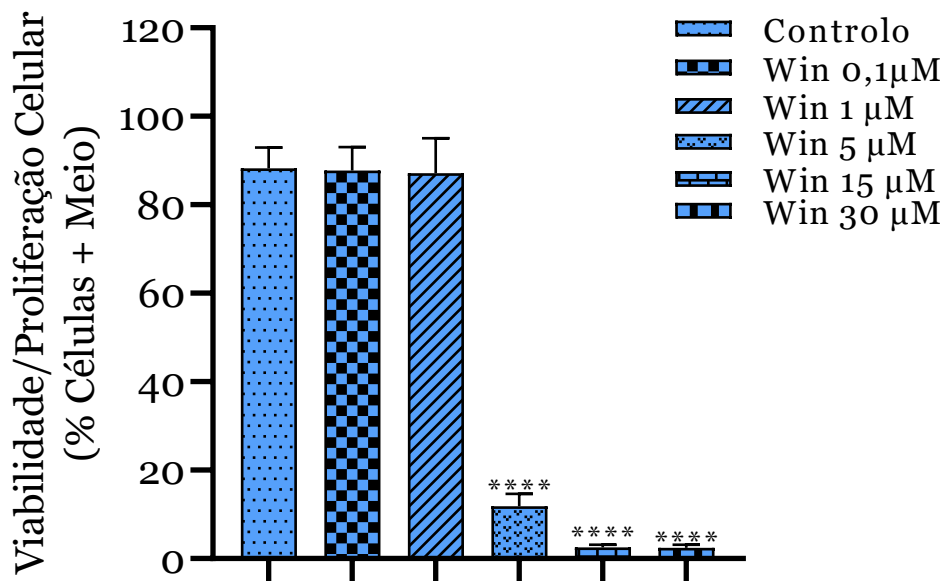


Figura 19 – Viabilidade/proliferação celular da linha U373 para concentrações de Win entre 0,1 μM e 30 μM. As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (0,1-30 μM), de veículo (controlo) ou apenas de meio. Os resultados representam a média ± epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 8 experiências (n=8), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade/proliferação celular apresenta redução significativamente estatística para concentrações de Win 5 μM, 15 μM e 30μM, em comparação com o controlo (**** P<0,0001; ANOVA seguida de teste de *Tukey*). As concentrações mais baixas (0,1 μM e 1 μM) não promovem a redução da viabilidade/proliferação celular (P>0,05).

A viabilidade/proliferação celular para a linha U87, apresentada na figura 20, segue a mesma tendência que a linha anterior (U373). As concentrações de Win 0,1 μM e de Win 1 μM não afetaram significativamente ($P > 0,05$) a viabilidade/proliferação celular comparativamente ao controlo (veículo). Já as restantes concentrações produziram uma acentuada e significativa ($P < 0,0001$) redução da viabilidade/proliferação celular (Win 5 μM – 91,42%, Win 15 μM – 95,76% e Win 30 μM – 96,76% de redução relativamente ao controlo) em relação à condição controlo.

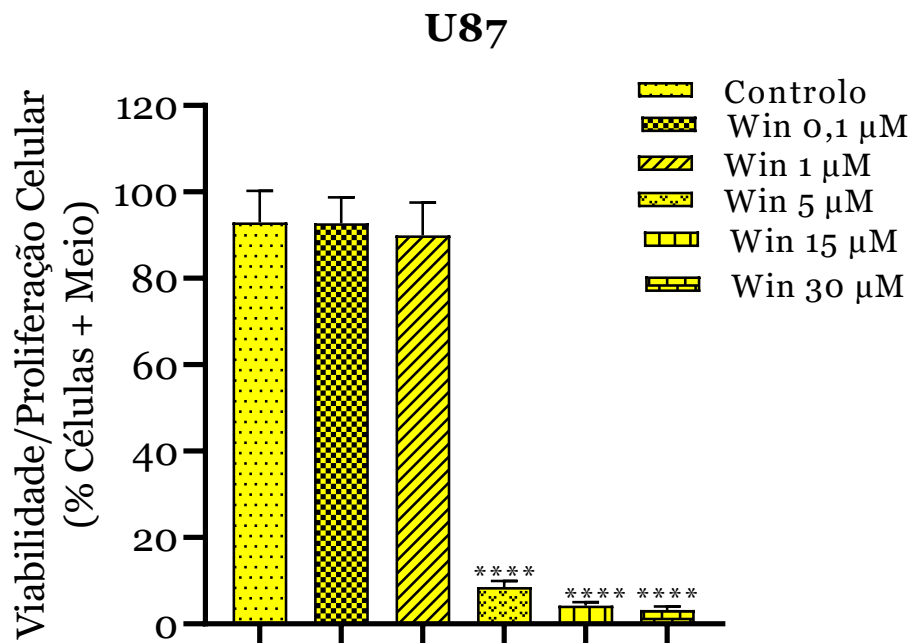


Figura 20 – Viabilidade/proliferação celular da linha U87 para concentrações de Win entre 0,1 μM e 30 μM . As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (0,1-30 μM), de veículo (controlo) ou apenas de meio. Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 8 experiências ($n=8$), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade/proliferação celular apresenta redução significativamente estatística para concentrações de Win 5 μM , 15 μM e 30 μM , em comparação com o controlo (**** $P < 0,0001$; ANOVA seguida de teste de *Tukey*). As concentrações mais baixas (0,1 μM e 1 μM) não promovem a redução da proliferação das células ($P > 0,05$).

Apesar do perfil de comportamento ser similar às outras linhas, as SNB19 apresentam uma redução menos acentuada do efeito do Win na viabilidade/proliferação celular para a concentração de Win 5 μM . Tal como nas linhas anteriores, também nas SNB19 as concentrações de Win 0,1 μM e de Win 1 μM não reduzem significativamente ($P > 0,05$) a viabilidade/proliferação celular comparativamente ao controlo. As concentrações superiores produziram uma diminuição da proliferação celular estatisticamente significativa ($P < 0,0001$) em relação à condição controlo (Win 5 μM – 67,11%, Win 15 μM – 93,96% e Win 30 μM – 94,68% de redução relativamente ao controlo), como apresentado na figura 21.

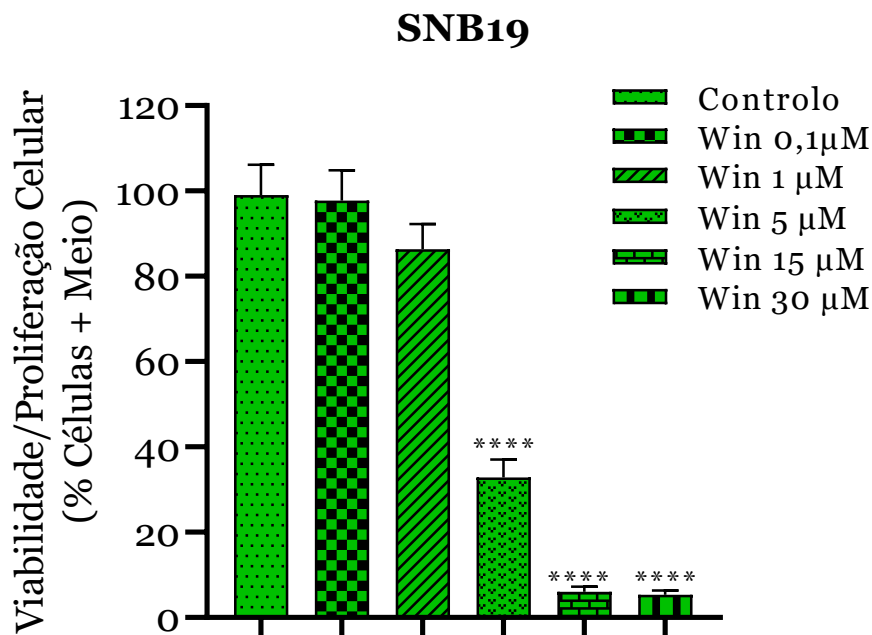


Figura 21 – Viabilidade/proliferação celular da linha SNB19 para concentrações de Win entre 0,1 μM e 30 μM . As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (0,1-30 μM), de veículo (controlo) ou apenas de meio. Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 8 experiências ($n=8$), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade celular apresenta redução significativamente estatística para concentrações de Win 5 μM , 15 μM e 30 μM , em comparação com o controlo (**** $P < 0,0001$; ANOVA seguida de teste de *Tukey*). As concentrações mais baixas (0,1 μM e 1 μM) não promovem a redução da proliferação das células ($P > 0,05$).

1.2 Avaliação do efeito na viabilidade/proliferação celular utilizando um intervalo de concentrações de Win, para os HA

Avaliou-se a viabilidade/proliferação celular dos HA quando expostos a concentrações de Win entre 0,1 μM a 5 μM durante 72h. No ensaio com os HA analisou-se, apenas, as concentrações de Win 0,1 μM , 1 μM e 5 μM , pois os estudos anteriores evidenciaram que as concentrações superiores (15 μM e 30 μM) anularam quase por completo a viabilidade/proliferação celular.

Similarmente ao observado nas linhas, no caso dos HA as concentrações de Win 0,1 μM e de Win 1 μM não afetaram significativamente ($P > 0,05$) a viabilidade/proliferação celular, comparativamente ao controlo (veículo). No caso do Win 5 μM observou-se uma redução acentuada da viabilidade celular (91,25% de redução relativamente ao controlo), como demonstrado na figura 22.

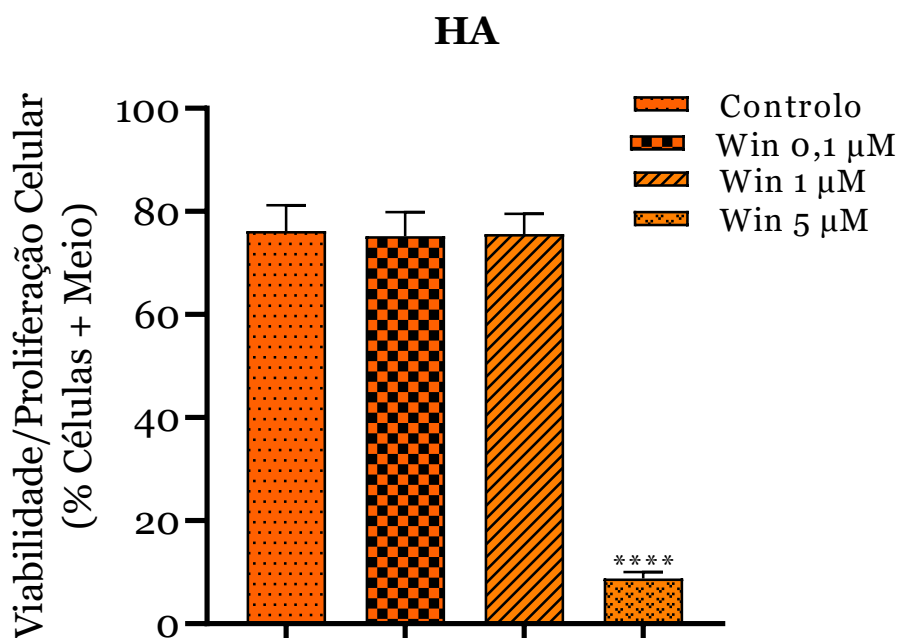


Figura 22 – Viabilidade/proliferação celular dos HA para concentrações de Win entre 0,1 μM e 5 μM . As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (0,1-5 μM), de veículo (controlo) ou apenas de meio. Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 6 experiências ($n=6$), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade/proliferação celular apresenta redução significativamente estatística para a concentração de Win 5 μM em comparação com o controlo (**** $P < 0,0001$; ANOVA seguida de teste de Tukey). As concentrações mais baixas (0,1 μM e 1 μM) não promovem a redução da proliferação das células ($P > 0,05$).

1.3 Avaliação da curva Dose – Resposta (EC₅₀)

Para a elaboração da curva de dose - resposta das diferentes linhas de GBM e HA, do efeito do Win na viabilidade/proliferação celular em função da concentração de Win, calculou-se a partir das médias das absorvências obtidas pelo método do MTT correspondentes a cada uma das concentrações de Win, e para cada tipo de células, a percentagem de proliferação em relação ao controlo (veículo) e representou-se em função do logaritmo de cada concentração de Win.

Para cada tipo de célula, os valores da % de viabilidade/proliferação celular em função do log₁₀ da concentração de Win, foram ajustados pela função “dose-resposta – especial” do *software GraphPad* e o EC₅₀ (concentração que produz 50% do efeito máximo) foi calculado depois da normalização dos valores para um efeito máximo de 100%.

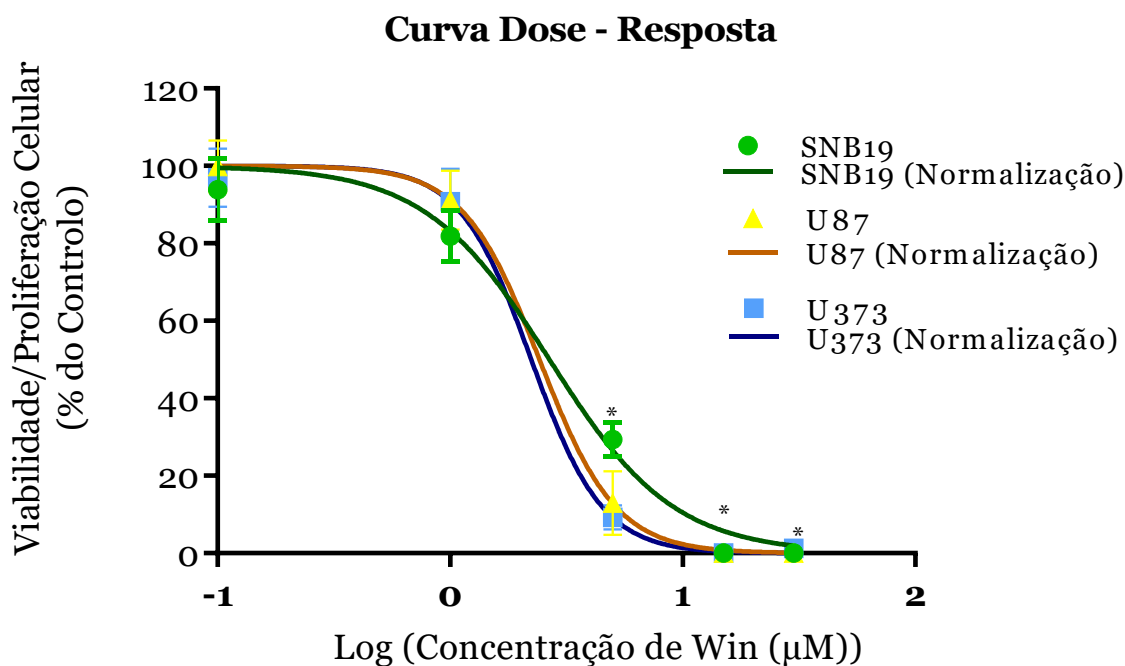


Figura 23 – Curva Dose-Resposta para as linhas U373, U87 e SNB19. As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (0,1-30 µM) ou de veículo (controlo). Os resultados representam a média ± epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 8 experiências (n=8), expressa em termos de % do controlo, em função do log₁₀ da concentração de Win. *P<0,0001, comparativamente com o controlo (ANOVA seguida de teste de *Tukey*).

A figura 23 apresenta a resposta que as diferentes linhas de GBM (U373, U87 e SNB19) têm em função da concentração de Win. Observou-se que a % de proliferação é reduzida com o aumento do logaritmo da concentração de Win, e por consequência do aumento da concentração de Win. O perfil é idêntico para as três linhas demonstrando que entre as concentrações de 1 μM e 5 μM de Win, ocorre uma drástica diminuição da proliferação, e que para valores superiores a 5 μM , chega próximo do zero. Fez igualmente parte desta análise, o cálculo dos valores de EC_{50} que para todos os tipos de células, tendo-se obtido os seguintes valores (μM): $\text{EC}_{50} - \text{U373} = 2,47$; $\text{EC}_{50} - \text{U87} = 2,21$; $\text{EC}_{50} - \text{SNB19} = 2,80$.

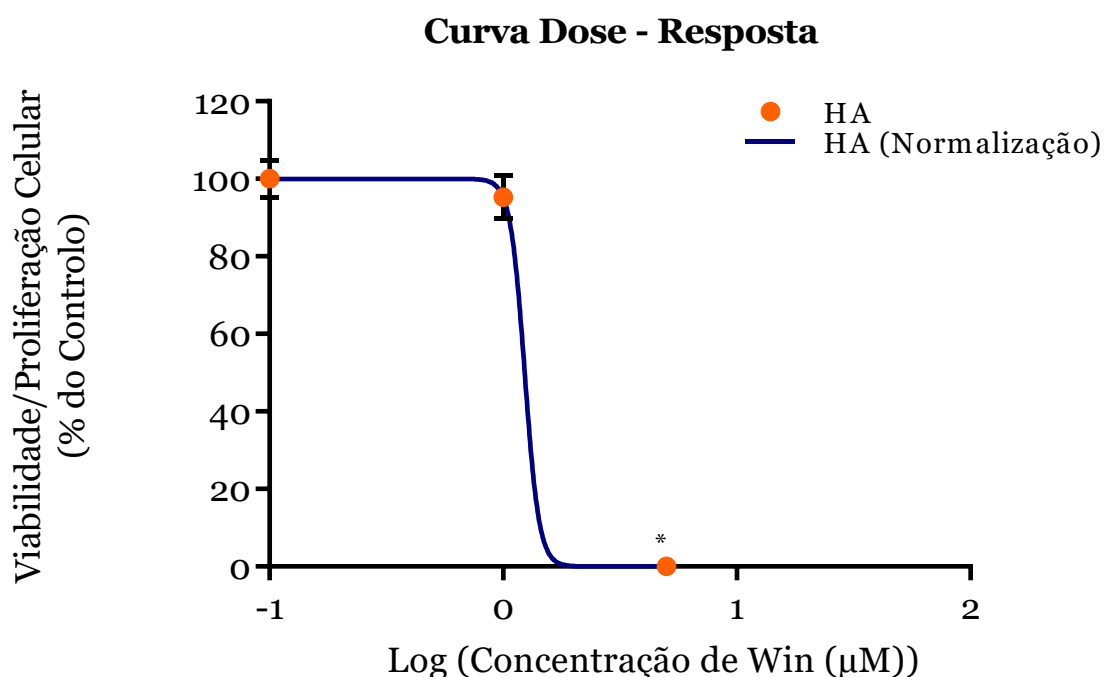


Figura 24 – Curva Dose-Resposta para os HA. Os HA foram incubados durante 72h na presença de Win (0,1-5 μM) ou de veículo (controle). Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 6 experiências (n=6), expressa em termos de % do controle, em função do \log_{10} da concentração de Win. * $P < 0,0001$, comparativamente com o controle (ANOVA seguida de teste de Tukey).

A figura 24 apresenta a curva Dose-Resposta da % de viabilidade/proliferação celular em função do \log_{10} da concentração do Win, obtida para os HA. A tendência observada para os HA é similar à das células de GBM, ocorrendo a redução da % de proliferação com o aumento do logaritmo da concentração de Win, e por consequência do aumento da concentração de Win. Entre as concentrações de Win 1 μM e Win 5 μM acontece uma diminuição da proliferação muito acentuada, e é neste intervalo que está situado o valor de $\text{EC}_{50} - \text{HA} = 1,51 \mu\text{M}$.

2 Avaliação da influência do aumento da concentração de adenosina no efeito inibitório do Win 5 μ M na viabilidade/proliferação celular

Depois de se avaliar a dependência da concentração de Win no efeito deste na sobrevivência/proliferação nas linhas de GBM e nos HA, e de se calcular os valores de EC_{50} , que para todos os tipos de células ficaram compreendidos entre as concentrações de Win 1 μ M a 5 μ M, selecionou-se como concentração para estudos posteriores o Win 5 μ M e avaliou-se se o efeito deste seria alterado na presença de elevadas concentrações de Ado. Avaliou-se também se a influência da Ado no efeito do Win seria mediada por ativação dos recetores da Ado. Para tal procedeu-se à realização de ensaios na ausência ou na presença de *cocktail* de antagonistas de todos os recetores da Ado (C.A.). Foram utilizados os seguintes antagonistas, nas concentrações indicadas: 15 μ M-DPCPX, 10 μ M-SCH 58261, 0,1 μ M-MRS 1754 e 1,5 μ M-MRE 3008F20; estas concentrações são capazes de bloquear efetivamente e seletivamente a ativação pela Ado dos recetores A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 humanos da Ado, respetivamente (Fredholm *et al.*, 2001).

Devido ao rápido metabolismo da Ado, foi essencial assegurar que os valores se mantinham elevados. Para tal, adotou-se dois procedimentos diferentes: 1) reforçar de 8 horas em 8 horas os níveis de Ado disponíveis, adicionado Ado a 30 μ M; ou 2) bloquear a ADK, através do ABT (inibidor da ADK), impedindo que a Ado se convertesse em AMP, e assim se mantivessem os níveis endógenos de Ado elevados.

A viabilidade/proliferação celular foi avaliada, pelo método do MTT, após incubação durante 72h com Win (5 μ M) ou veículo (controlo) na presença ou ausência de Ado (30 μ M) /ABT (30 μ M) e na presença ou na ausência de C.A.. Os resultados apresentados nas figuras 25 a 32 correspondem às médias \pm epm, em percentagem relativamente ao ensaio células + meio, das absorvências registadas.

2.1 Avaliação da influência da adenosina exógena no efeito inibitório do Win 5 μ M na viabilidade/proliferação celular

Como podemos observar na figura 25, na linha de GBM, U373, na ausência de C.A. as células quando expostas a Ado 30 μ M não sofreram alteração significativa da viabilidade/proliferação celular ($P > 0,05$) comparativamente com a condição controle (veículo). Pelo contrário, o Win 5 μ M, à semelhança do observado nos ensaios anteriores, reduz significativamente a viabilidade/proliferação (85,5% de redução relativamente à condição células + meio), comparativamente com o controle ($P < 0,0001$). No caso da condição de C.A., que serviu como um controle para todas as condições que continham a mistura de antagonistas dos recetores de Ado e onde se bloqueou os quatro recetores de Ado, observou-se uma redução significativa (41,08% de redução relativamente à condição células + meio) comparativamente ao controle ($P < 0,01$). Tal como observado na ausência de C.A., a adição de Ado (30 μ M) exógena não afetou a viabilidade/proliferação celular na presença de C.A. ($P > 0,05$, comparando a condição de C.A.+Ado com a condição C.A.). Por outro lado, quer a presença de C.A. quer de C.A.+Ado não preveniu o efeito inibitório do Win 5 μ M na viabilidade/proliferação celular (ver figura 25), embora pareça haver uma tendência para a redução do efeito do Win 5 μ M na presença de C.A.+Ado comparativamente ao efeito deste na presença de C.A. O fato do C.A. sozinho reduzir a viabilidade/proliferação celular comparativamente com o controle (veículo), sugere que a Ado endógena basal teria um efeito protetor na viabilidade/proliferação celular, provavelmente por ativação dos recetores A_1 e A_{2A} da Ado, e esse efeito protetor seria removido pelo bloqueio dos recetores pelo C.A.

U373 ± Ado

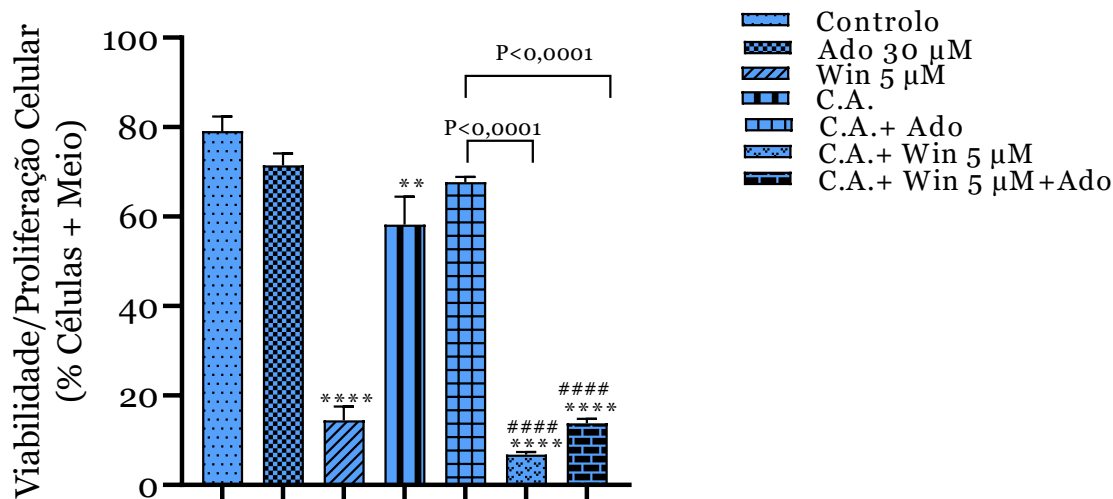


Figura 25 - Viabilidade/proliferação celular da linha U373 obtida na presença de Win (5 µM) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de Ado (30 µM). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 µM), de veículo (controlo), de Ado (30 µM), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Ado, de C.A.+Win., de C.A.+Win 5 µM+Ado ou apenas de meio. Os resultados representam a média ± epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 4 experiências (n=4), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade celular apresenta redução estatisticamente significativa da concentração de Win 5 µM, do C.A., do C.A.+Win 5 µM e C.A.+Win 5 µM+Ado em relação ao controlo (** P<0,01; **** P<0,0001). Em relação ao C.A. observa-se a redução com significância estatística para C.A.+Win 5 µM e C.A.+Win 5 µM+Ado (#### P<0,0001) e uma diferença com significância estatística entre as condições de C.A.+Ado e C.A.+Win 5 µM+Ado (P<0,0001) (ANOVA seguida de teste de *Tukey*).

No caso da linha U87, tal como apresentado na figura 26, a Ado 30 μM não afetou a viabilidade/proliferação celular quer na ausência quer na presença de C.A. ($P > 0,05$) comparativamente ao controlo (veículo). Neste caso, o C.A. sozinho também não modificou significativamente a viabilidade/proliferação celular ($P > 0,05$) relativamente ao controlo. Já para o Win 5 μM a redução da viabilidade/proliferação celular é estatisticamente significativa ($P < 0,0001$; comparativamente com o controlo) e muito acentuada (94,37% redução relativamente à condição células + meio). À semelhança das células U373, também nas células U87, quer a presença de C.A. quer de C.A.+Ado. não preveniu o efeito inibitório do Win 5 μM na viabilidade/proliferação celular (figura 26). De facto, as condições (C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado) sofrem reduções estatisticamente significativa em relação às condições C.A. ($P < 0,0001$) e C.A.+Ado ($P < 0,0001$), respetivamente.

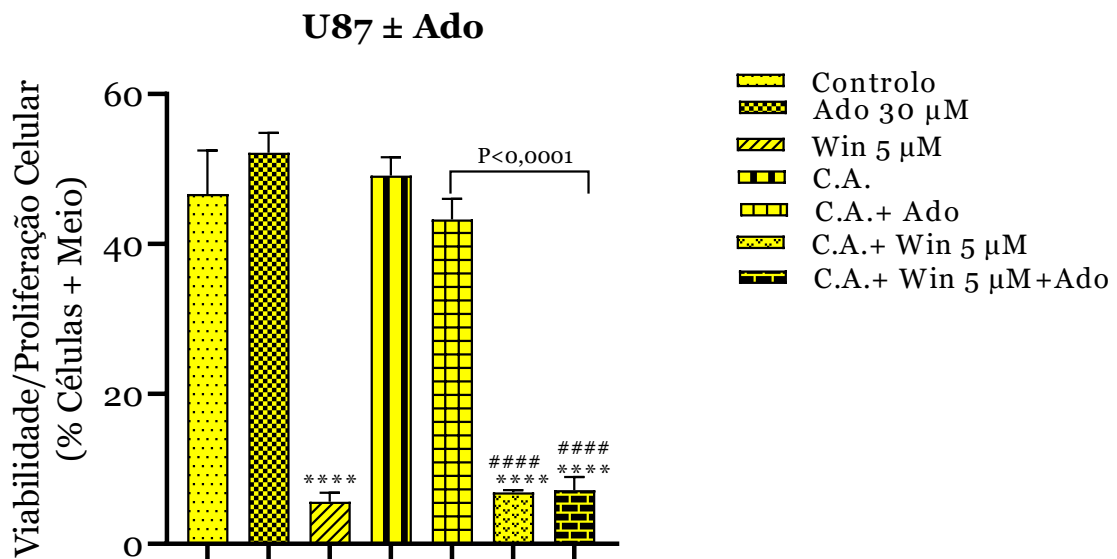


Figura 26 - Viabilidade/proliferação celular da linha U87 obtida na presença de Win (5 μM) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de Ado (30 μM). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 μM), de veículo (controlo), de Ado (30 μM), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Ado, de C.A.+Win., de C.A.+Win 5 μM +Ado ou apenas de meio. Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 4 experiências ($n=4$), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade celular apresenta redução estatisticamente significativa da concentração de Win 5 μM , do C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado em relação ao controlo (**** $P < 0,0001$). Em comparação com o C.A. verifica-se a redução estatisticamente significativa para C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado (#### $P < 0,0001$) e uma relação com estatisticamente significativa entre as condições de C.A.+Ado e C.A.+Win 5 μM +Ado ($P < 0,0001$) (ANOVA seguida de teste de Tukey).

Na linha SNB19 (figura 27) a Ado 30 μM não afetou a viabilidade/proliferação celular quer na ausência quer na presença de C.A. ($P > 0,05$) comparativamente ao controlo (veículo). Pelo contrário, o Win 5 μM reduziu significativamente ($P < 0,0001$) a viabilidade/proliferação celular comparativamente com o controlo. À semelhança da linha U373, também neste caso, o C.A. sozinho reduziu significativamente a viabilidade/proliferação celular ($P < 0,05$) relativamente ao controlo. À semelhança das células U373 e U87, também nas células SNB19, quer na presença de C.A. quer de C.A.+Ado não preveniu o efeito inibitório do Win 5 μM na viabilidade/proliferação celular (figura 27), embora pareça haver uma tendência para a redução do efeito do Win 5 μM na presença de C.A.+Ado comparativamente ao efeito deste na presença de C.A.

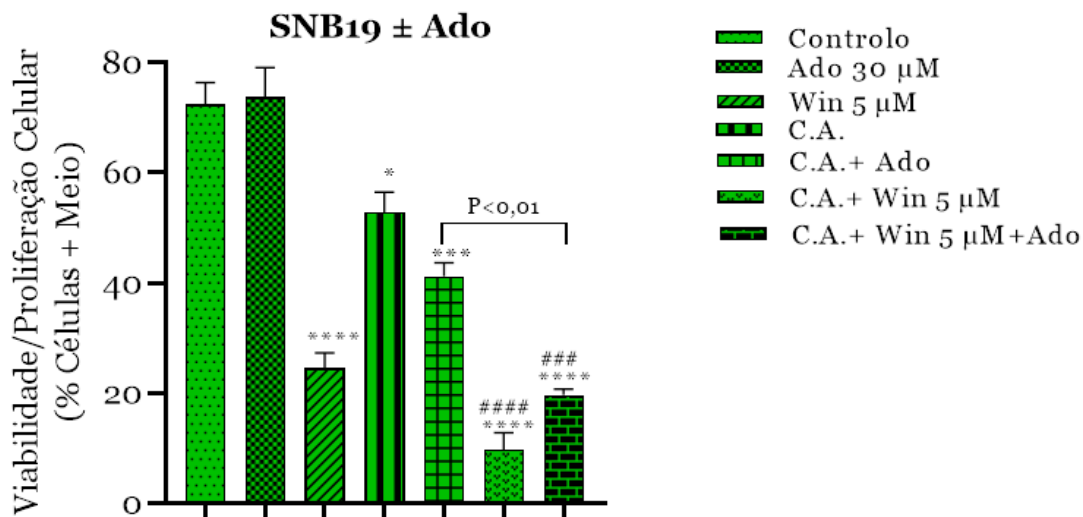


Figura 27 - Viabilidade/proliferação celular da linha SNB19 obtida na presença de Win (5 μM) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de Ado (30 μM). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 μM), de veículo (controlo), de Ado (30 μM), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Ado, de C.A.+Win., de C.A.+Win 5 μM +Ado ou apenas de meio. Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 4 experiências ($n=4$), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade celular apresenta redução estatisticamente significativa da concentração de Win 5 μM , do C.A, do C.A.+Ado, do C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado em relação ao controlo (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). Em relação ao C.A. observa-se a redução estatisticamente significativa para C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado (### $P < 0,001$ e #### $P < 0,0001$) e diferença estatisticamente significativa entre as condições de C.A.+Ado e C.A.+Win 5 μM +Ado ($P < 0,01$) (ANOVA seguida de teste de *Tukey*).

Tal como representado na figura 28, nos HA, e contrastando com o observado nas linhas celulares, a Ado 30 μM (adicionada de 8 horas em 8 horas) produziu uma redução na viabilidade/proliferação celular ($P < 0,001$) comparativamente ao controlo (veículo) na ausência mas não na presença de C.A. Similarmente ao observado nas linhas U373 e SNB19, também no caso dos HA, o C.A. sozinho reduziu significativamente a viabilidade/proliferação celular ($P < 0,05$) relativamente ao controlo. No caso do Win 5 μM , à semelhança do observado nas linhas celulares, observou-se uma redução acentuada da viabilidade/proliferação ($P < 0,0001$) comparativamente ao controlo. À semelhança das linhas U373, U87 e SNB19, também nos HA o efeito inibitório do Win 5 μM na viabilidade/proliferação celular não foi prevenido quer pela presença de C.A. quer de C.A.+Ado (figura 28).

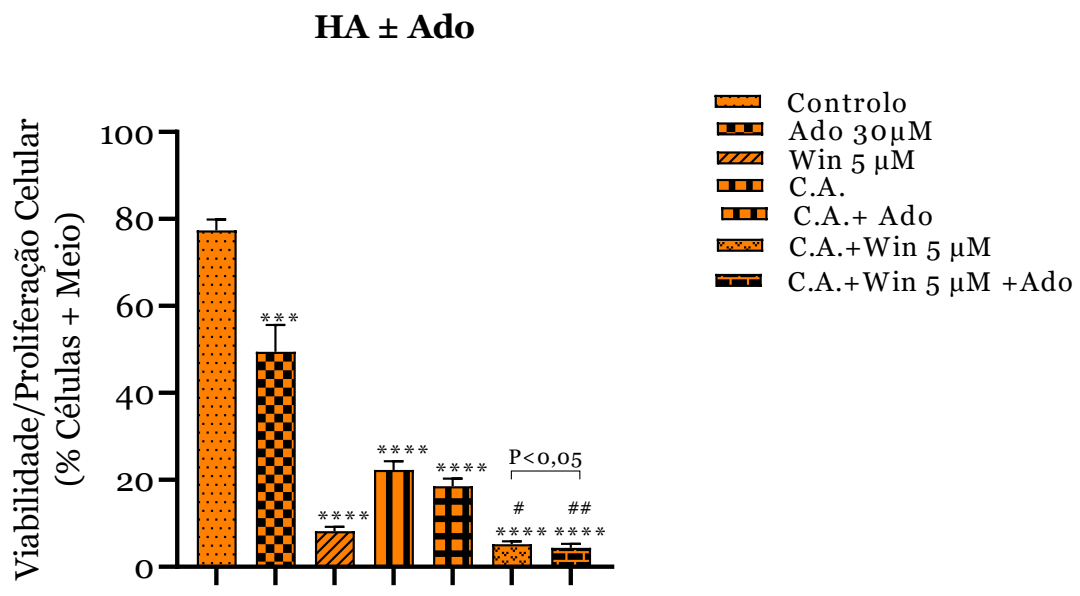


Figura 28 - Viabilidade/proliferação celular do HA obtida na presença de Win (5 μM) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de Ado (30 μM). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 μM), de veículo (controlo), de Ado (30 μM), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Ado, de C.A.+Win., de C.A+Win 5 μM +Ado ou apenas de meio. Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 3 experiências ($n=3$), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade celular apresenta redução estatisticamente significativa da concentração da Ado 30 μM , Win 5 μM , do C.A, do C.A.+Ado, do C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado em relação ao controlo (*** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). Comparativamente ao C.A. verifica-se a redução estatisticamente significativa com C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado (# $P < 0,05$; ## $P < 0,01$). (ANOVA seguida de teste de *Tukey*). Observou-se também diferença estatisticamente significativa entre as condições de C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado ($P < 0,05$) (ANOVA seguida de teste de *Tukey*).

2.2 Avaliação da influência de um inibidor da ADK no efeito inibitório do Win 5 μM na viabilidade/proliferação celular

Neste grupo de estudos utilizou-se o ABT para inibir a ADK e fazer com que os níveis de Ado endógenos se mantivessem elevados.

A figura 29 mostra que quando as células U373 são tratadas com a ABT (30 μM) na presença de C.A. sofrem uma redução da viabilidade/proliferação celular ($P < 0,05$; comparativamente ao ensaio com C.A.). Na ausência de C.A., embora haja uma tendência para redução da viabilidade/proliferação celular por ação do ABT (30 μM), esta não é estatisticamente significativa. Quando as células foram tratadas com Win 5 μM observou-se uma redução acentuada da viabilidade/proliferação celular quer na ausência ($P < 0,0001$; comparativamente ao controlo) quer na presença de C.A. ($P < 0,001$; comparativamente ao ensaio C.A.). Por outro lado, a presença de C.A.+ABT. não preveniu o efeito inibitório do Win 5 μM na viabilidade/proliferação celular (ver figura 29), embora pareça haver uma tendência para a redução do efeito do Win 5 μM na presença de C.A.+ABT. comparativamente ao efeito deste na presença de C.A..

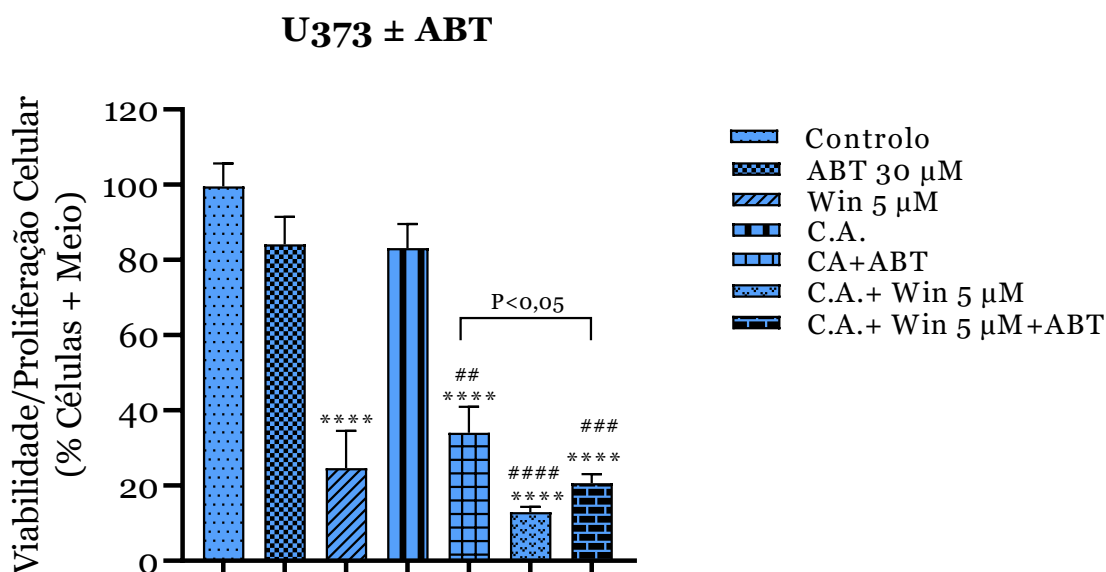


Figura 29 – Viabilidade/proliferação celular da linha U373 obtida na presença de Win (5 μM) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de ABT (30 μM). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 μM), de veículo (controlo), de ABT (30 μM), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+ABT, de C.A.+Win 5 μM , de C.A.+Win 5 μM +ABT ou apenas de meio. Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 4 experiências ($n=4$), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade celular apresenta redução estatisticamente significativa concentração de Win 5 μM , do C.A.+ABT, do C.A.+Win 5 μM e do C.A.+Win 5 μM +ABT em relação ao controlo (**** $P < 0,0001$). Em comparação com C.A. a redução é estatisticamente significativa para C.A.+ABT, C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +ABT (## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$; #### $P < 0,0001$) e observa-se diferença com significância estatística entre as condições de C.A.+ABT e C.A.+Win 5 μM +ABT ($P < 0,05$) (ANOVA seguida de teste de *Tukey*).

Tal como representado na figura 30, na linha U87 o ABT (30 μ M) provocou a redução da viabilidade/proliferação celular apenas na presença ($P < 0,01$; comparativamente ao ensaio C.A.) mas não na ausência ($P > 0,05$; comparativamente ao controlo) de C.A.. O C.A. sozinho não modificou significativamente a viabilidade/proliferação celular ($P > 0,05$) relativamente ao controlo. A presença de Win 5 μ M produziu uma redução acentuada da viabilidade/proliferação celular quer na ausência ($P < 0,0001$; comparativamente ao controlo) quer na presença de C.A. ($P < 0,0001$; comparativamente ao ensaio C.A.). Por outro lado, na presença de C.A.+ABT, embora pareça haver uma tendência para a redução da viabilidade/proliferação celular por ação do Win 5 μ M, esta não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$; comparando o ensaio C.A.+Win 5 μ M+ABT com C.A.+ABT), sugerindo uma atenuação do efeito do Win pela presença simultânea de ABT e C.A. (ver figura 30).

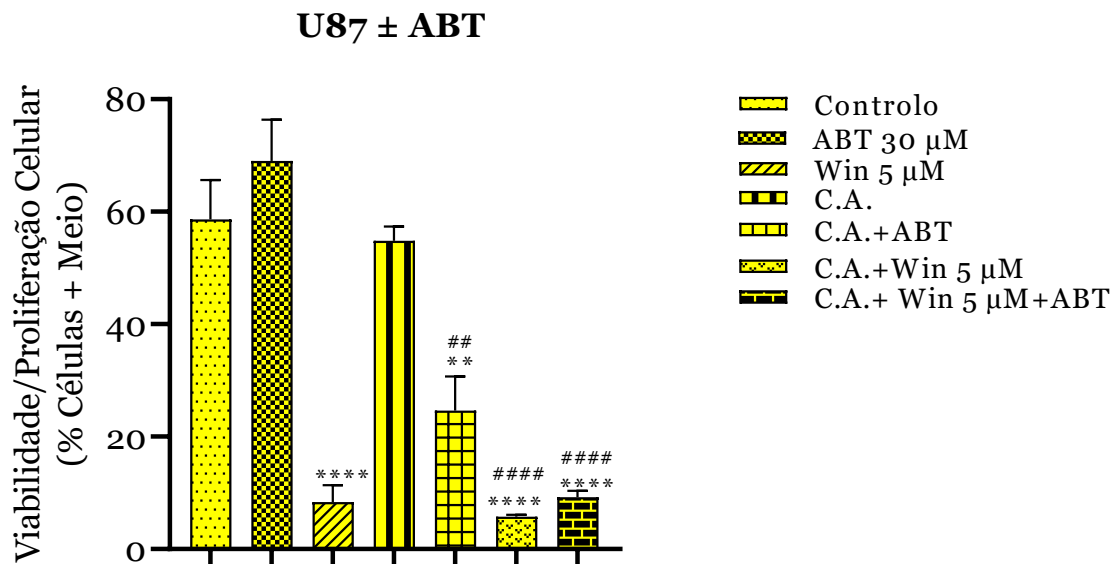


Figura 30 – Viabilidade/proliferação celular da linha U87 obtida na presença de Win (5 μ M) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de ABT (30 μ M). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 μ M), de veículo (controlo), de ABT (30 μ M), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+ABT, de C.A.+Win 5 μ M, de C.A.+Win 5 μ M+ABT ou apenas de meio. Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 4 experiências (n=4), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade celular apresenta redução estatisticamente significativa concentração de Win 5 μ M, do C.A.+ABT, do C.A.+Win 5 μ M e do C.A.+Win 5 μ M+ABT em relação ao controlo (** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). Em comparação com C.A. a redução é estatisticamente significativa para C.A.+ABT, C.A.+Win 5 μ M e C.A.+Win 5 μ M+ABT (## $P < 0,01$; #### $P < 0,0001$) (ANOVA seguida de teste de Tukey).

Tal como indicado na figura 31, na linha SNB19 o ABT 30 μM na presença de C.A. provocou uma redução da viabilidade/proliferação celular ($P < 0,01$; comparativamente ao ensaio com C.A.). Na ausência de C.A., embora haja uma tendência para redução da viabilidade/proliferação celular por ação do ABT 30 μM , esta não é estatisticamente significativa. O C.A. sozinho não alterou significativamente a viabilidade/proliferação celular ($P > 0,05$) quando comparado com o controlo. O Win 5 μM causou uma redução acentuada da viabilidade/proliferação celular quer na ausência ($P < 0,01$; comparativamente ao controlo) quer na presença de C.A. ($P < 0,0001$; comparativamente ao ensaio C.A.). Similarmente ao que fora observado na linha U87, na linha SNB19 na presença de C.A.+ABT. embora pareça haver uma tendência para a redução da viabilidade/proliferação celular por ação do Win 5 μM , esta não é estatisticamente significativa ($P > 0,05$; comparando o ensaio C.A.+Win 5 μM +ABT com C.A.+ABT), sugerindo uma atenuação do efeito do Win pela presença simultânea de ABT e C.A. (ver figura 31).

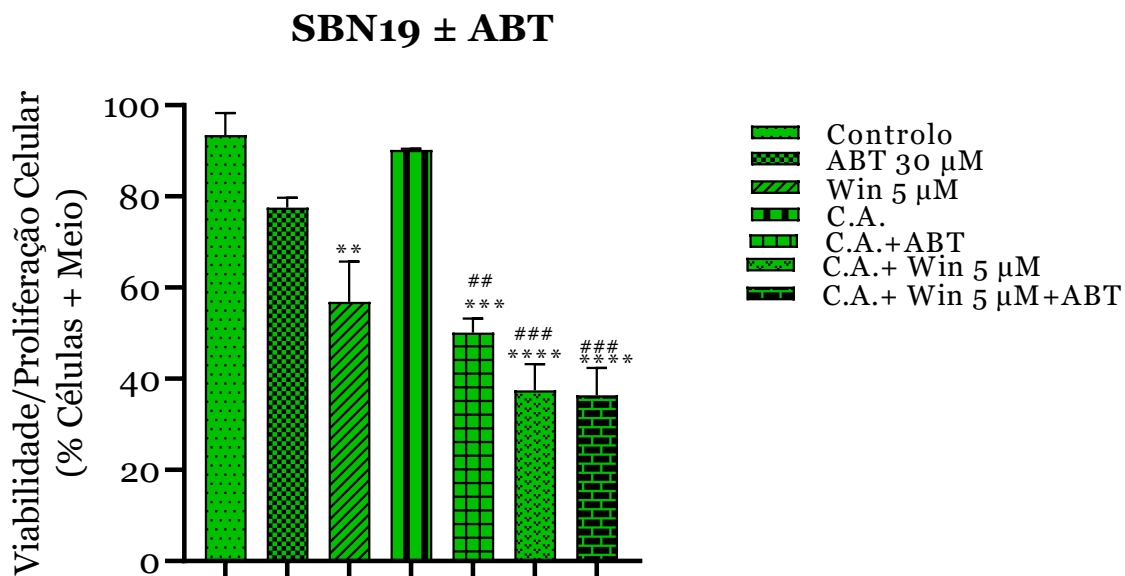


Figura 31 – Viabilidade/proliferação celular da linha SNB19 obtida na presença de Win (5 μM) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de ABT (30 μM). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 μM), de veículo (controlo), de ABT (30 μM), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+ABT, de C.A.+Win 5 μM , de C.A.+Win 5 μM +ABT ou apenas de meio. Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 4 experiências ($n=4$), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade celular apresenta redução estatisticamente significativa para a concentração de Win 5 μM , do C.A.+ABT, do C.A.+Win 5 μM e do C.A.+Win 5 μM +ABT em relação ao controlo (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$). Em comparação com C.A. a redução é estatisticamente significativa para C.A.+ABT, C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +ABT (## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$) (ANOVA seguida de teste de Tukey).

No caso dos astrócitos humanos normais, HA, observou-se uma grande redução da viabilidade/proliferação celular para todas as condições (figura 32). Assim, o ABT (30 μ M) causou uma redução acentuada da viabilidade/proliferação celular quer na ausência (**** $P < 0,0001$; comparativamente com o controlo) quer na presença de C.A. (## $P < 0,01$; comparativamente com C.A.). O C.A. sozinho produziu uma redução de $47\% \pm 10\%$ na viabilidade/proliferação celular (** $P < 0,01$) comparativamente ao controlo. O Win 5 μ M causou uma redução acentuada da viabilidade/proliferação celular quer na ausência (**** $P < 0,0001$; comparativamente ao controlo) quer na presença de C.A. (## $P < 0,01$; comparativamente ao ensaio C.A.). Similarmente ao que fora observado nas linhas U87 e SNB19, nos HA na presença de C.A.+ABT o Win 5 μ M não modificou significativamente a viabilidade/proliferação celular ($P > 0,05$; comparando o ensaio C.A.+Win 5 μ M+ABT com C.A.+ABT), sugerindo também neste caso uma atenuação do efeito do Win 5 μ M pela presença simultânea de ABT e C.A. (ver figura 32).

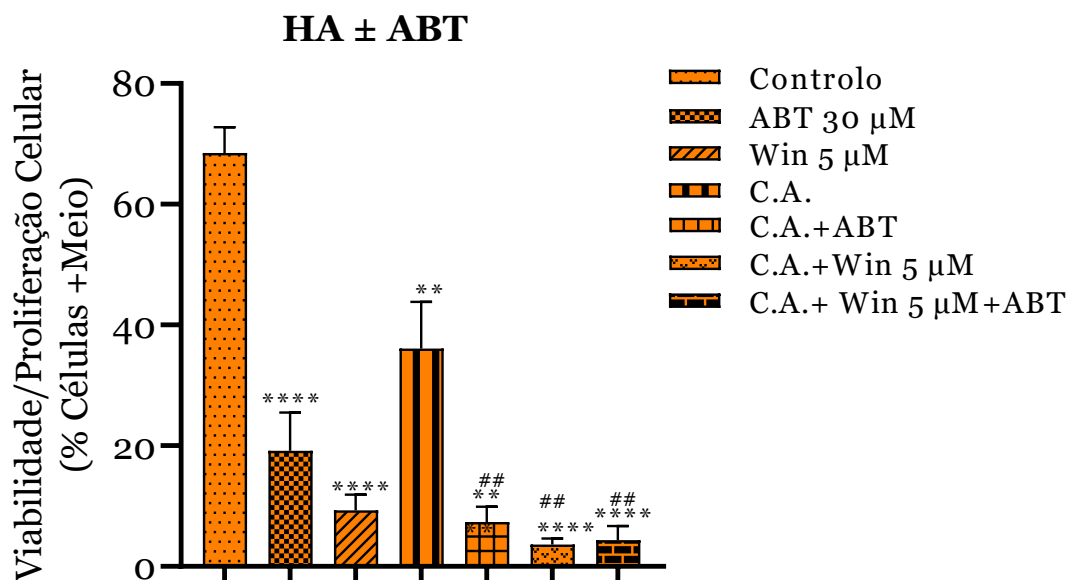


Figura 32 – Viabilidade/proliferação celular do HA obtida na presença de Win (5 μ M) na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de ABT (30 μ M). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 μ M), de veículo (controlo), de ABT (30 μ M), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+ABT, de C.A.+Win 5 μ M, de C.A.+Win 5 μ M+ABT ou apenas de meio. Os resultados representam a média \pm epm da viabilidade/proliferação, correspondente a 3 experiências (n=3), expressa em termos de % do ensaio células + meio. A viabilidade celular apresenta redução estatisticamente significativa da concentração de ABT 30 μ M; Win 5 μ M, C.A.; C.A.+ABT, C.A.+Win 5 μ M e C.A.+Win 5 μ M+ABT em relação ao controlo (** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$). Relativamente ao C.A. a redução é estatisticamente significativa para C.A.+ABT, C.A.+Win 5 μ M e C.A.+Win 5 μ M+ABT (## $P < 0,01$) (ANOVA seguida de teste de Tukey).

2.3 Avaliação da influência da adenosina exógena e de um inibidor da ADK na percentagem de inibição produzida pelo Win 5 µM na viabilidade/proliferação celular.

Depois de analisar como os níveis aumentados de Ado, na ausência ou na presença de C.A., afetavam o efeito do Win 5 µM na viabilidade/proliferação celular em termos absolutos (expresso como percentagem da viabilidade/proliferação do ensaio células + meio), fomos analisar como o aumento da concentração de Ado afetava o efeito do Win 5 µM em termos relativos. Para tal a % de inibição da viabilidade/proliferação celular obtida na presença de Win 5 µM, C.A.+ Win 5 µM e C.A.+Win 5 µM+ Ado/ABT foi expressa em relação à viabilidade/proliferação celular obtida nos ensaios controlo (veículo), C.A. e C.A.+Ado/ABT, respetivamente.

Para tal, e através das médias de absorvência obtidas para os ensaios de MTT correspondentes a cada condição, calculou-se três novos parâmetros de estudo:

$$\left(1 - \frac{\text{absorvência do ensaio Win } 5 \mu\text{M}}{\text{absorvência do ensaio Controlo}}\right) \times 100, \quad \left(1 - \frac{\text{absorvência do ensaio C.A.+Win } 5 \mu\text{M}}{\text{absorvência do ensaio C.A.}}\right) \times 100 \quad \text{e}$$
$$\left(1 - \frac{\text{absorvência do ensaio C.A.+W in } 5 \mu\text{M+(Ado ou ABT)}}{\text{absorvência do ensaio C.A.+(Ado ou ABT)}}\right) \times 100, \quad \text{cujas diferenças foram}$$

posteriormente comparados entre si por ANOVA. Os resultados obtidos para as três linhas de GBM (U373, U87 e SNB19) e para os astrócitos humanos normais (HA) encontram-se representados nas figuras 33 a 36.

Como se pode observar nas figuras 33 a 36, a incubação das células na presença de ABT e C.A. produziu uma redução do efeito inibitório do Win comparativamente ao efeito inibitório deste obtido apenas na presença de C.A., quer para as 3 linhas estudadas quer para os HA. A incubação das células na presença de Ado exógena e C.A. produziu uma redução do efeito inibitório do Win comparativamente ao efeito inibitório deste obtido na presença de C.A., apenas na linha U373 (figura 33). Os resultados sugerem assim que o aumento da Ado endógena por inibição da ADK pelo ABT, produz uma atenuação do efeito inibitório do Win na viabilidade/proliferação celular e que essa atenuação é observada mesmo quando os recetores da Ado estão bloqueados pelo *cocktail* de antagonistas (C.A.).

Quanto à influência do bloqueio dos recetores da Ado pelo C.A. no efeito inibitório do Win na viabilidade/proliferação celular, a presença de C.A. não afetou o efeito do Win quer nas células U373 quer U87. Nas células SNB19 e HA, os resultados foram contraditórios. Nas células SNB19 a presença de C.A. produziu um aumento no efeito do Win apenas no conjunto de experiências no qual se avaliou a influência do ABT no efeito do Win, mas não no conjunto de experiências em que se avaliou a influência da Ado (figura 35). Quanto aos HA, a presença de C.A. produziu uma diminuição no efeito

do Win apenas no conjunto de experiências no qual se avaliou a influência da Ado no efeito do Win, mas não no conjunto de experiências em que se avaliou a influência do ABT (figura 36). Estas diferenças poderão ser devidas à diferença de condições de incubação das células no período em que se realizaram os 2 conjuntos de experiências, Ado e ABT, uma vez que a taxa de utilização das incubadoras variou bastante durante a realização dos estudos, por isso seria de esperar que nos períodos em que a taxa utilização das incubadoras fosse maior, as condições de incubação a que as células estavam sujeitas diferisse das condições em que a taxa de utilização das incubadoras fosse menor.

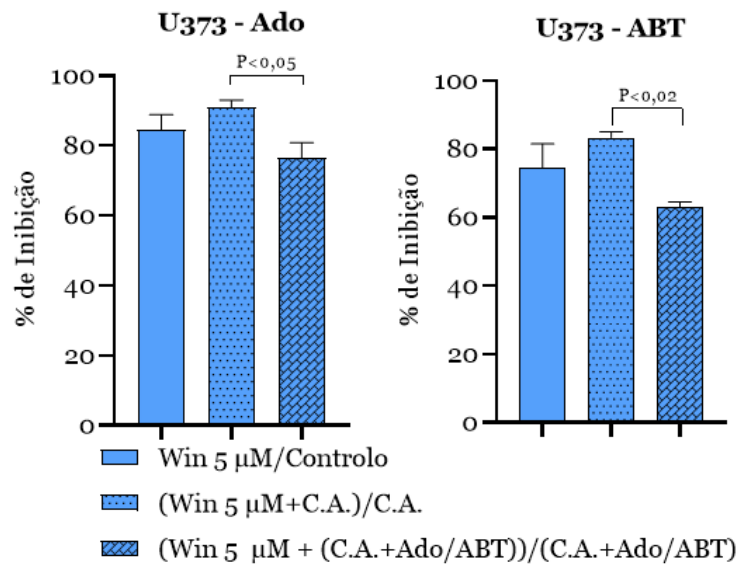


Figura 33 – Influência da Ado e do ABT na percentagem de inibição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo Win 5 µM, para a linha U373. As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 µM), de veículo (controlo), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Win 5 µM, de C.A.+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM) ou de C.A.+Win 5 µM+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM). Os resultados representam a média ± epm do efeito inibitório do Win 5 µM na viabilidade/proliferação, correspondente a 4 experiências (n=4), expressa em termos de % do ensaio controlo correspondente. A percentagem de inibição do Win 5 µM obtida quer na presença de Ado quer de ABT, é inferior à obtida na presença de apenas C.A. (P<0,05 e P<0,01, respetivamente; ANOVA seguida de teste de Tukey).

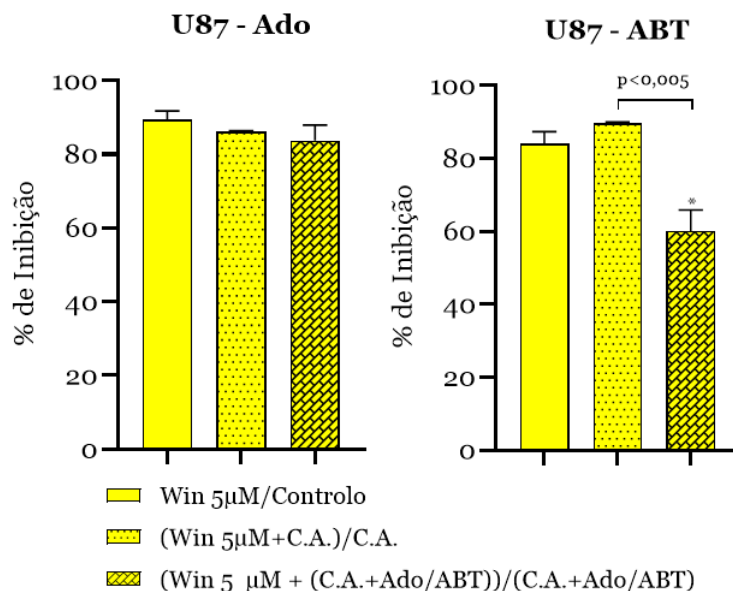


Figura 34 – Influência da Ado e do ABT na percentagem de inibição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo Win 5 µM, para a linha U87. As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 µM), de veículo (controlo), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Win 5 µM, de C.A.+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM) ou de C.A.+Win 5 µM+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM). Os resultados representam a média ± epm do efeito inibitório do Win na viabilidade/proliferação, correspondente a 4 experiências (n=4), expressa em termos de % do ensaio controlo correspondente. A percentagem de inibição do Win 5 µM obtida na presença de ABT, é inferior à obtida na presença de apenas do C.A. ($P < 0,005$; ANOVA seguida de teste de Tukey).

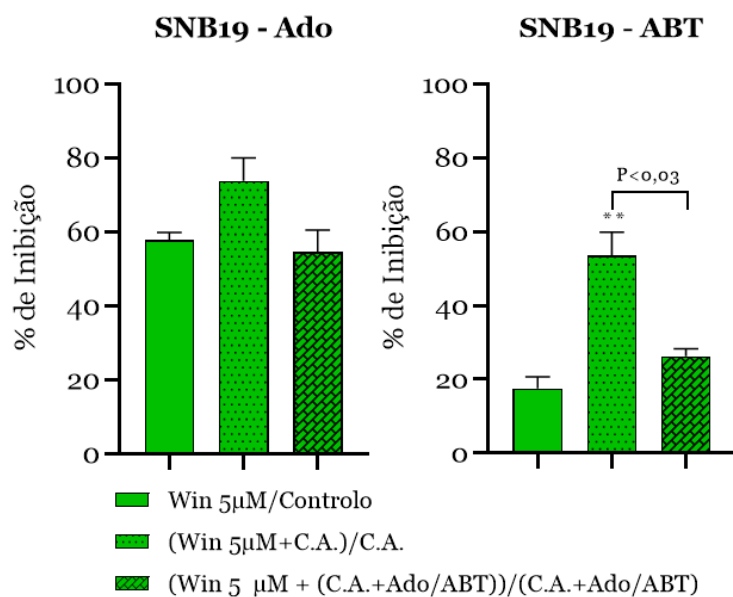


Figura 35 – Influência da Ado e do ABT na percentagem de inibição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo Win 5 µM, para a linha SNB19. As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 µM), de veículo (controlo), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Win 5 µM, de C.A.+ (Ado 30 µM ou ABT 30 µM) ou de C.A.+Win 5 µM+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM). Os resultados representam a média ± epm do efeito inibitório do Win na viabilidade/proliferação, correspondente a 4 experiências (n=4), expressa em termos de % do ensaio controlo correspondente. A percentagem de inibição do Win 5 µM obtida na presença de ABT, é inferior à obtida na presença de apenas do C.A. ao contrário do conjuntos de experiências com Ado ($P < 0,03$; ANOVA seguida de teste de Tukey).

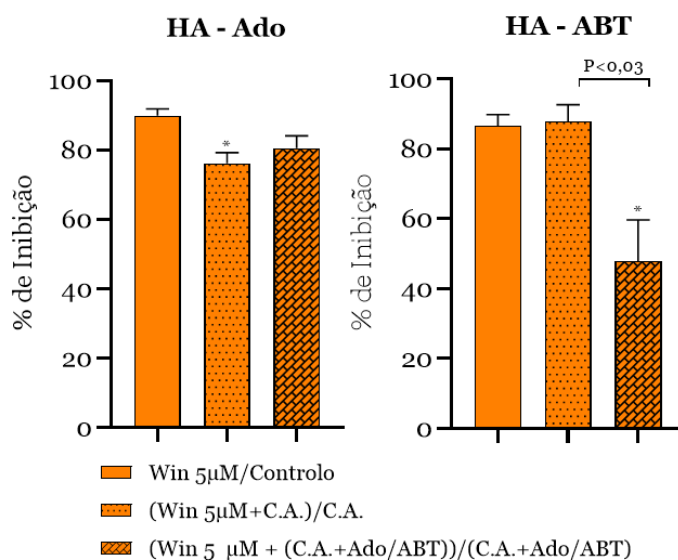


Figura 36 – Influência da Ado e do ABT na percentagem de inibição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo Win 5 µM, para os HA. As células foram incubadas durante 72h na presença de Win (5 µM), de veículo (controlo), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Win 5 µM, de C.A.+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM) ou de C.A.+Win 5 µM+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM). Os resultados representam a média ± epm do efeito inibitório do Win na viabilidade/proliferação, correspondente a 4 experiências (n=3), expressa em termos de % do ensaio controlo correspondente. A percentagem de inibição do Win 5 µM obtida na presença de ABT, é inferior à obtida na presença de apenas do C.A., situação diferente da que ocorreu no conjunto de experiências com Ado ($P < 0,03$; ANOVA seguida de teste de Tukey).

3 Avaliação da influência do aumento da concentração de adenosina na citotoxicidade celular induzida pelo Win – Ensaio LDH

A citotoxicidade celular foi avaliada nas diferentes culturas de linhas de GBM e HA pelo ensaio da libertação da LDH. As células, depois de 72 horas expostas às condições descritas anteriormente na secção 3.2 do Capítulo B, foram sujeitas ao protocolo descrito na secção 4, do mesmo capítulo.

Para a elaboração dos cálculos foi tido em conta o número de células para cada condição. Dada a dificuldade em determinar diretamente o número de células em cada poço da placa de 96, calculou-se uma estimativa da densidade celular para cada condição tendo como base a densidade celular da condição controlo para cada tipo de célula, obtida em estudos prévios do grupo, e tendo em conta a proporcionalidade direta entre a densidade celular e os valores de absorvência do ensaio do MTT, de acordo com a fórmula

$$\text{número de células da condição } x = \frac{(\text{densidade celular do controlo}) \times (\text{absorvência do ensaio MTT da condição } x)}{\text{absorvência do ensaio MTT do controlo}}$$

Assim os valores apresentados nos gráficos das figuras 37 a 40 foram determinados

através da equação $\frac{\text{média LDH } (\mu\text{U/mL}) \text{ da condição } x \times \text{volume de meio (mL)}}{\text{densidade celular da condição } x \left(\frac{\text{células}}{\text{cm}^2}\right) \times \text{Área do Poço (cm}^2\text{)}} \times 1000$ em que o

volume de meio foi de 0,150 mL e a área do poço foi de 0,32 cm². Foram realizados 3 ensaios para cada estudo.

Tal como representado na figura 37, para a linha U373, o aumento da concentração de Ado, por adição de Ado exógena (figura 37 b) ou por inibição da ADK pelo ABT (figura 37 a), não modificou os níveis de LDH libertado, quer na ausência quer na presença de C.A. ($P > 0,05$; comparativamente com as condições controlo e com o C.A., respetivamente). O C.A. também não produziu alteração na atividade de LDH libertada comparativamente com o controlo ($P > 0,05$). Pelo contrário, a presença de Win 5 μM produziu um aumento apreciável na atividade de LDH libertada ($*P < 0,05$; comparativamente ao controlo). O efeito do Win 5 μM na libertação de LDH não foi prevenido quer pela presença de C.A., quer pela presença de C.A.+Ado/ABT ($*P < 0,05$; comparativamente ao C.A. e ao C.A.+Ado/ABT, respetivamente); embora se observe uma tendência para a diminuição da LDH libertada na condição C.A.+Win 5 μM +Ado/ABT comparativamente à condição C.A.+Win 5 μM (figura 37).

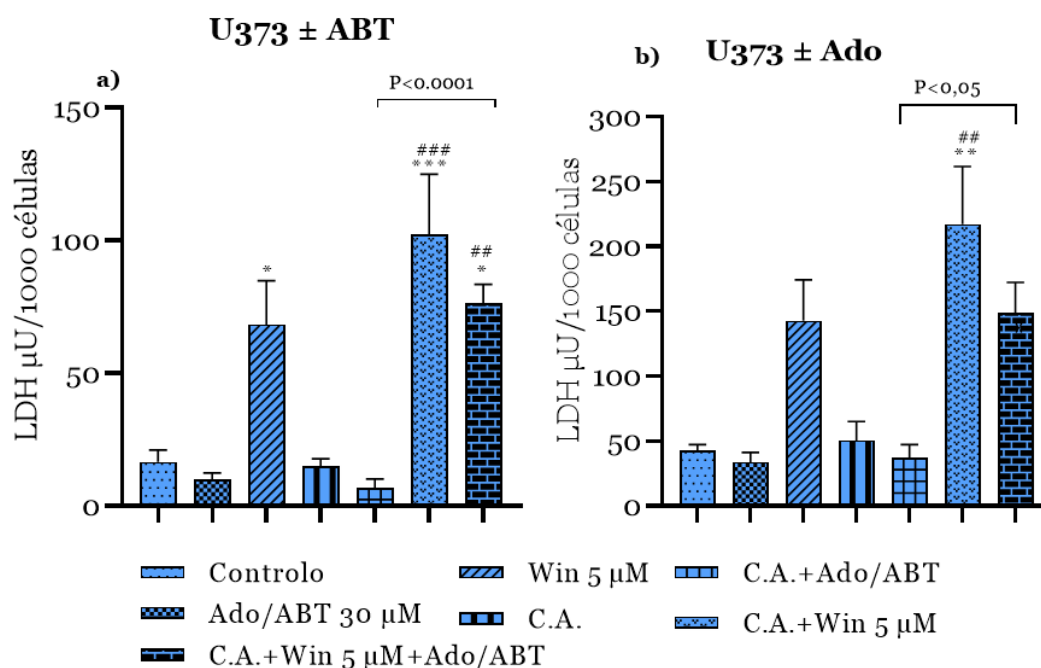


Figura 37 – Atividade da LDH libertada ($\mu\text{U}/1000$ células) para a linha U373 obtida na presença de Win 5 μM na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de a) ABT (30 μM) ou b) Ado (30 μM). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win 5 μM , de veículo (controlo), de Ado (30 μM) ou ABT (30 μM), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Ado/ABT, de C.A.+Win 5 μM ou de C.A.+Win 5 μM +Ado/ABT. Os resultados representam a média \pm epm da atividade de LDH libertada, correspondente a 3 experiências ($n=3$), expressa em termos de $\mu\text{U}/1000$ células.

a) Estudos com ABT: aumento estatisticamente significativo da atividade de LDH para Win 5 μM (* $P<0,05$), C.A.+Win 5 μM (** $P<0,001$) e C.A.+Win 5 μM +ABT (* $P<0,05$) em relação ao controlo, e aumento estatisticamente significativo em relação a C.A. da condição C.A.+Win 5 μM (### $P<0,001$) e C.A.+Win 5 μM +ABT (## $P<0,01$). Variação estatisticamente significativa entre C.A.+ABT e C.A.+Win 5 μM +ABT ($P<0,0001$). b) Estudos com Ado: aumento estatisticamente significativo de Win 5 μM e de C.A.+Win 5 μM em relação ao controlo (** $P<0,01$) e ao C.A. (## $P<0,01$). Variação estatisticamente significativa entre C.A.+Ado e C.A.+Win 5 μM +Ado com $P<0,05$ (ANOVA seguida de teste de Tukey).

Relativamente à linha U87 (figura 38) apresenta um comportamento similar ao da linha U373. Assim, a presença de ABT (figura 38 a) ou a adição de Ado exógena (figura 38 b), não modificou os níveis de LDH libertado, quer na ausência quer na presença de C.A. ($P > 0,05$; comparativamente com as condições controlo e com o C.A., respetivamente). Também neste caso a presença de C.A. não alterou a atividade de LDH libertada comparativamente com o controlo ($P > 0,05$). Já a presença de Win 5 μM produziu um aumento considerável na atividade de LDH libertada ($*P < 0,05$; comparativamente ao controlo). Este efeito do Win 5 μM na libertação de LDH não foi prevenido quer pela presença de C.A., quer pela presença de C.A.+Ado/ABT ($*P < 0,05$; comparativamente ao C.A. e ao C.A.+Ado/ABT, respetivamente), no entanto observou-se uma redução da LDH libertada na condição C.A.+Win 5 μM +ABT comparativamente à condição C.A.+Win 5 μM ($***P < 0,001$; figura 38 a) bem como uma tendência para a diminuição da libertação de LDH na condição C.A.+Win 5 μM +Ado comparativamente à condição C.A.+Win 5 μM (figura 38 b) sugerindo uma atenuação do efeito do Win 5 μM pelo aumento da concentração de Ado.

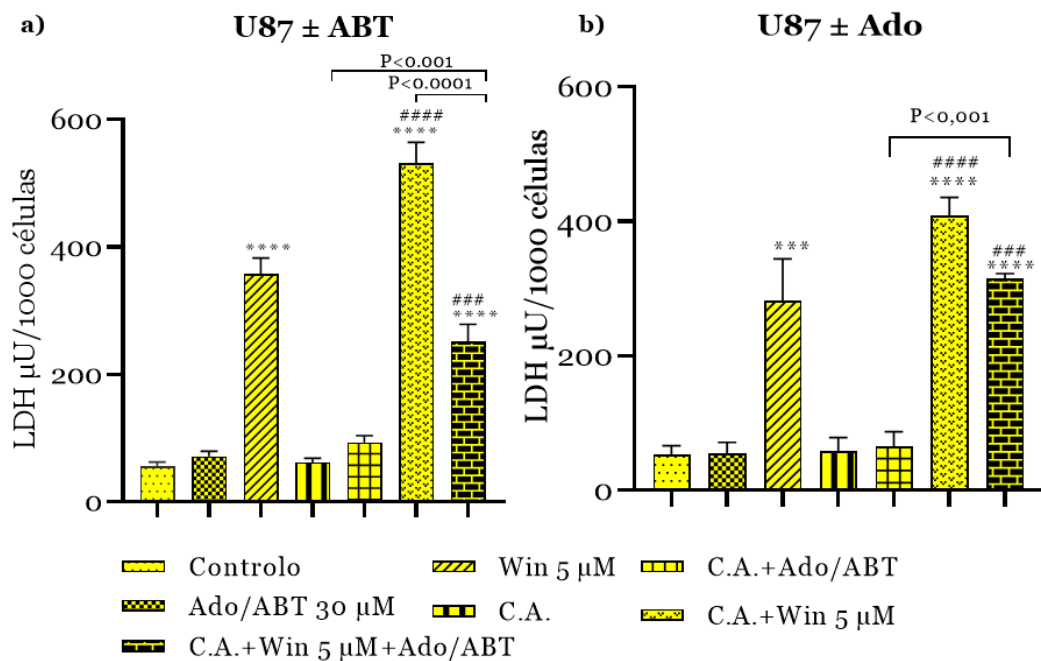


Figura 38 – Atividade da LDH libertada ($\mu\text{U}/1000$ células) para a linha U87 obtida na presença de Win 5 μM na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de a) ABT (30 μM) ou b) Ado (30 μM). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win 5 μM , de veículo (controlo), de Ado (30 μM) ou ABT (30 μM), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Ado/ABT, de C.A.+Win 5 μM ou de C.A.+Win 5 μM +Ado/ABT. Os resultados representam a média \pm epm da atividade de LDH libertada, correspondente a 3 experiências ($n=3$), expressa em termos de $\mu\text{U}/1000$ células. a) Estudos com ABT: aumento estatisticamente significativo da atividade de LDH para Win 5 μM ($*P<0,0001$), C.A.+Win 5 μM ($****P<0,0001$) e C.A.+Win 5 μM +ABT ($*P<0,0001$) em relação ao controlo, e aumento estatisticamente significativo em relação a C.A. da condição C.A.+Win 5 μM ($####P<0,0001$) e C.A.+Win 5 μM +ABT ($###P<0,001$). Variação estatisticamente significativa entre C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +ABT ($P<0,0001$) e C.A.+ABT e C.A.+Win 5 μM +ABT ($P<0,001$). b) Estudos com Ado: aumento estatisticamente significativo de Win 5 μM ($***P<0,001$), C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado em relação ao controlo ($****P<0,0001$) e ao C.A. ($####P<0,0001$ e $###p<0,001$). Variação significativamente estatística entre C.A.+Ado e C.A.+Win 5 μM +Ado ($P<0,001$) (ANOVA seguida de teste de *Tukey*).

Relativamente à linha SNB19, tal como representado na figura 39 a) e b), apresenta um perfil semelhante à linha U373 mas com valores de atividade de LDH mais baixos para o conjunto de experiências onde se estudou a influência do ABT (figura 39 a). A presença de ABT (figura 39 a) ou a adição de Ado exógena (figura 39 b), não modificou os níveis de LDH libertado, quer na ausência quer na presença de C.A. ($P > 0,05$; comparativamente com as condições controlo e com o C.A., respetivamente). Também nestas células a presença de C.A. não afetou a atividade de LDH libertada comparativamente com o controlo ($P > 0,05$). Por outro lado a presença de Win 5 μM produziu um aumento significativo na atividade de LDH libertada ($P < 0,05$; comparativamente ao controlo). Este efeito do Win 5 μM na libertação de LDH não foi prevenido quer pela presença de C.A. (figura 39 a e 39 b), quer pela presença de C.A.+Ado (figura 39 b) ($P < 0,05$; comparativamente ao C.A. e ao C.A.+Ado, respetivamente).

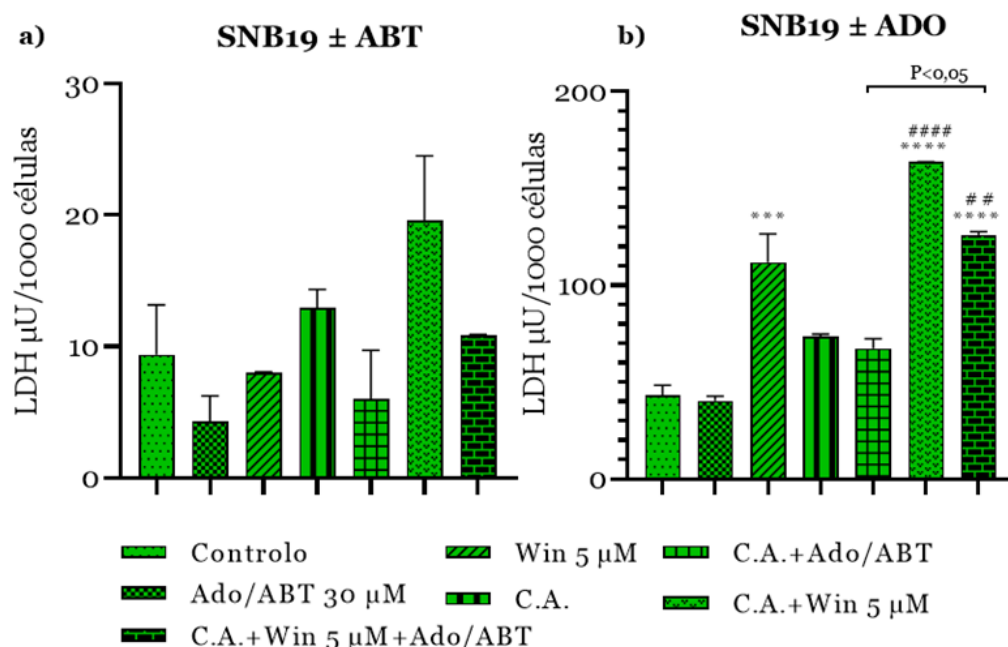


Figura 39 – Atividade da LDH libertada ($\mu\text{U}/1000$ células) para a linha SNB19 obtida na presença de Win 5 μM na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de a) ABT (30 μM) ou b) Ado (30 μM). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win 5 μM , de veículo (controlo), de Ado (30 μM) ou ABT (30 μM), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Ado/ABT, de C.A.+Win 5 μM ou de C.A.+Win 5 μM +Ado/ABT. Os resultados representam a média \pm epm da atividade de LDH libertada, correspondente a 3 experiências ($n=3$), expressa em termos de $\mu\text{U}/1000$ células. a) Estudos com ABT: Win 5 μM aumenta a LDH. b) Estudos com Ado: aumento estatisticamente significativo de Win 5 μM (***) $P < 0,001$, C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado em relação ao controlo (****) $P < 0,0001$ e ao das últimas duas condições mencionadas em relação ao C.A. (####) $P < 0,0001$ e (##) $P < 0,01$). Variação significativamente estatística entre C.A.+Ado e C.A.+Win 5 μM +Ado ($P < 0,05$) (ANOVA seguida de teste de Tukey).

Relativamente às células HA, tal como apresentado na figura 40, o perfil da atividade de LDH libertada nas diferentes condições estudadas diferiu do observado nas linhas de GBM em diversos aspetos. No conjunto de experiências em que se estudou a influência da Ado exógena no efeito do Win 5 μM (figura 40 b), a adição de Ado exógena não modificou os níveis de LDH libertado, quer na ausência quer na presença de C.A. ($P > 0,05$; comparativamente com as condições controlo e com o C.A., respetivamente). No entanto, nestas células, ao contrário do observado nas linhas celulares, a presença de C.A. aumentou a atividade de LDH libertada comparativamente com o controlo ($P < 0,0001$). Isto sugere que nos HA, a Ado endógena poderá estar a exercer um efeito protetor por ativação dos recetores da Ado, o qual será removido na presença dos antagonistas dos recetores. Por outro lado, e tal como observado nas linhas, a presença de Win 5 μM produziu um aumento significativo na atividade de LDH libertada ($****P < 0,0001$; comparativamente ao controlo). Este efeito do Win 5 μM na libertação de LDH não foi prevenido quer pela presença de C.A. quer pela presença de C.A.+Ado (figura 40 b) ($****P < 0,0001$; comparativamente ao C.A. e ao C.A.+Ado, respetivamente), no entanto observou-se um aumento da LDH libertada na condição C.A.+Win 5 μM +Ado comparativamente à condição C.A.+Win 5 μM ($****P < 0,0001$; figura 40 b), sugerindo uma potenciação do efeito do Win 5 μM pelo aumento da concentração de Ado. Relativamente ao conjunto de experiências em que se estudou a influência do ABT no efeito do Win 5 μM (figura 40 a), os resultados foram um tanto inesperados. De acordo com os resultados obtidos, a adição de ABT aumentou os níveis de LDH libertada na presença de C.A. ($P < 0,05$; comparativamente com a condição C.A.), o que difere do observado quer nas linhas quer em estudos prévios realizados pelo grupo nos HA. Quanto ao Win 5 μM , tal como observado nas linhas, este produziu um aumento significativo na atividade de LDH libertada na presença de C.A. (figura 40 a) ($**P < 0,01$; comparativamente ao C.A.). De referir que neste conjunto de experiências, o erro associado à atividade de LDH obtido nas diferentes condições (figura 40 a) foi muito elevado, o que sugere que poderá ter havido algum problema com as condições experimentais de incubação das células neste conjunto de experiências, o que poderá explicar os resultados atípicos obtidos

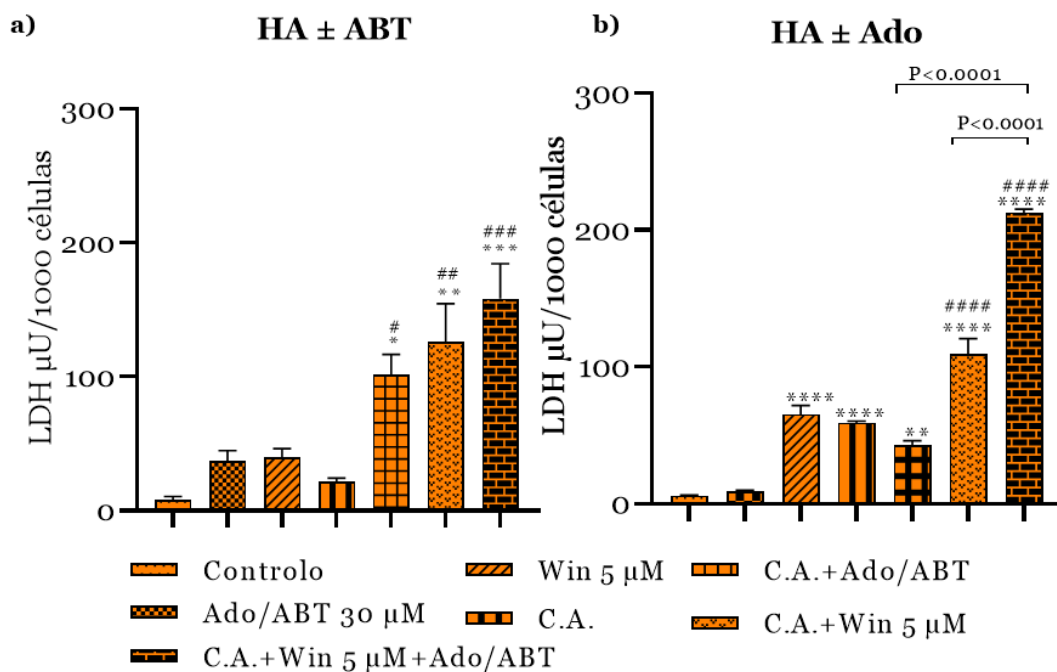


Figura 40 – Atividade da LDH libertada ($\mu\text{U}/1000$ células) para os HA obtida na presença de Win 5 μM na presença ou na ausência de C.A. e na presença ou na ausência de a) ABT (30 μM) ou b) Ado (30 μM). As células foram incubadas durante 72h na presença de Win 5 μM , de veículo (controlo), de Ado (30 μM) ou ABT (30 μM), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Ado/ABT, de C.A.+Win 5 μM ou de C.A.+Win 5 μM +Ado/ABT. Os resultados representam a média \pm epm da atividade de LDH libertada, correspondente a 3 experiências ($n=3$), expressa em termos de $\mu\text{U}/1000$ células. a) Estudos com ABT: aumento estatisticamente significativo da atividade de LDH para C.A.+ABT (* $P<0,05$), C.A.+Win 5 μM (** $P<0,01$) e C.A.+Win 5 μM +ABT (** $P<0,001$) em relação ao controlo e ao C.A. b) Estudos com Ado: aumento estatisticamente significativo Win 5 μM , C.A., C.A.+Ado e C.A.+Win 5 μM +Ado (**** $P<0,0001$) e C.A.+Win 5 μM (** $P<0,01$) em relação ao controlo; e das últimas duas condições em relação ao C.A. (#### $P<0,0001$). Variação estatisticamente significativa C.A.+Win 5 μM e C.A.+Win 5 μM +Ado ($P<0,0001$) e entre C.A.+Ado e C.A.+Win 5 μM +Ado ($P<0,0001$) (ANOVA seguida de teste de Tukey).

3.1 Avaliação da influência da adenosina exógena e de um inibidor da ADK na percentagem de efeito produzido pelo Win 5 µM na libertação de LDH

Depois de avaliar em que medida o aumento da Ado, na ausência ou na presença de C.A., afetava o efeito do Win 5 µM na atividade da LDH libertada em termos absolutos (expressa em µU de LDH/1000 células), fomos analisar como o aumento da concentração de Ado afetava o efeito do Win 5 µM em termos relativos. Para tal a LDH libertada obtida na presença de Win 5 µM, C.A.+Win 5 µM. e C.A.+Win 5 µM+Ado/ABT foi expressa em termos da % da atividade da LDH libertada obtida nos ensaios controlo (veículo), C.A. e C.A.+Ado/ABT, respetivamente. Assim e através das médias de LDH libertada de cada condição, calculou-se três novos parâmetros de estudo:

$$\text{estudo: } \frac{\text{LDH no ensaio Win } 5\mu\text{M}}{\text{LDH no ensaio Controlo}} \times 100, \quad \frac{\text{LDH no ensaio C.A.+Win } 5\mu\text{M}}{\text{LDH no ensaio C.A.}} \times 100 \quad \text{e}$$
$$\frac{\text{LDH no ensaio Win } 5\mu\text{M+(C.A.+Ado ou ABT)}}{\text{LDH no ensaio C.A.+(Ado ou ABT)}} \times 100, \text{ cujas diferenças foram posteriormente}$$

comparados entre si por ANOVA. Os resultados obtidos para a três linhas de GBM (U373, U87 e SNB19) e para os HA encontram-se representados nas figuras 41 a 44.

Como se pode observar nas figuras 41 a 44, a incubação das células na presença de ABT e C.A. produziu uma redução do efeito do Win 5 µM, comparativamente ao efeito deste obtido na presença de C.A., na linha U87 e nos HA, mas não nas linhas U373 e SNB19 em que este efeito não foi afetado pela presença de ABT. A incubação das células na presença de Ado exógena e C.A. não afetou o efeito do Win, comparativamente ao efeito deste obtido na presença de C.A., em nenhuma das linhas estudadas. No entanto nos HA, na presença de Ado e C.A. observou-se um aumento do efeito do Win, comparativamente ao efeito deste na presença de C.A., contrastando com o observado na presença de ABT. Os resultados sugerem assim que o aumento da Ado endógena por inibição da ADK pelo ABT, produz uma atenuação do aumento da LDH induzido pelo Win apenas na linha U87 e nos HA, mas não nas linhas U373 e SNB19, e que essa atenuação é observada mesmo quando os recetores da Ado estão bloqueados pelo *cocktail* de antagonistas. No entanto, no caso dos HA, a adição de Ado exógena parece produzir o efeito contrário do ABT, aumentando a libertação de LDH induzida pelo Win 5 µM, mesmo com os recetores da Ado bloqueados.

Quanto à influência do bloqueio dos recetores da Ado pelo C.A. no efeito do Win 5 µM na libertação de LDH, os resultados são contraditórios. Assim, a presença de C.A. potenciou o efeito do Win 5 µM nas células U373 mas apenas no conjunto de experiências em que se estudou a influência da Ado no efeito do Win (figura 41 a). Pelo contrário, a presença de C.A. mostrou atenuar o efeito do Win nas células SNB19 e HA,

mas apenas no conjunto de experiências em que se estudou a influência do ABT ou da Ado no efeito do Win 5 μM , respetivamente. Estas diferenças poderão ser devidas à diferença de condições de incubação das células no período em que se realizaram os dois conjuntos de experiências, Ado e ABT, como já discutido anteriormente.

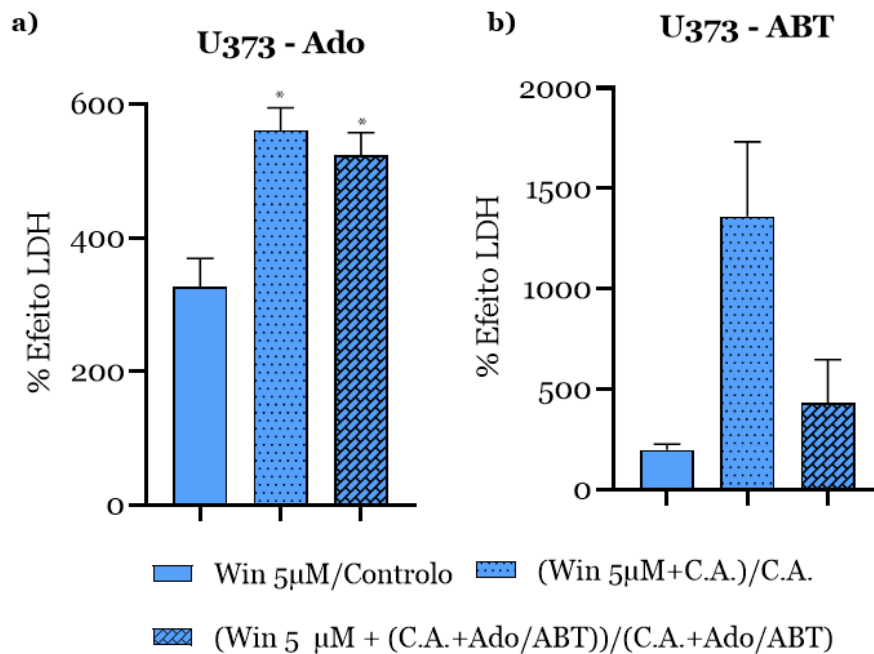


Figura 41 – Influência da Ado (a) e do ABT (b) no efeito do Win 5 μM na libertação de LDH, para a linha U373. As células foram incubadas durante 72h na presença de Win 5 μM , de veículo (controlo), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Win 5 μM , de C.A.+(Ado 30 μM ou ABT 30 μM) ou de C.A.+Win 5 μM +(Ado 30 μM ou ABT 30 μM). Os resultados representam a média \pm epm da LDH libertada na presença do Win 5 μM , correspondente a 3 experiências (n=3), expressa em termos de % do ensaio controlo correspondente. * $P < 0,05$ comparativamente a Win 5 μM /controlo (ANOVA seguida de teste de Tukey)

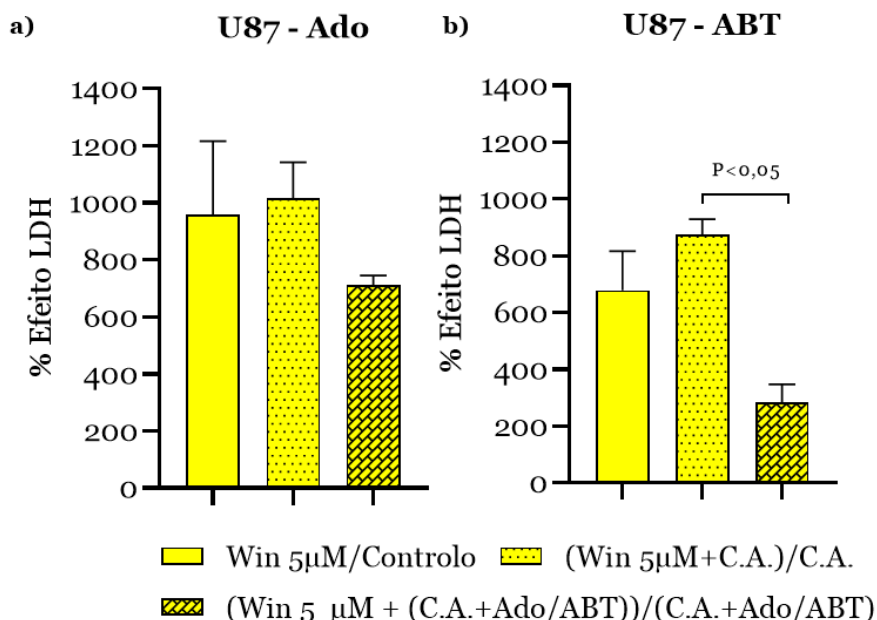


Figura 42 – Influência da Ado (a) e do ABT (b) no efeito do Win 5 µM na libertação de LDH, para a linha U87. As células foram incubadas durante 72h na presença de Win 5 µM, de veículo (controlo), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Win 5 µM, de C.A.+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM) ou de C.A.+Win 5 µM+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM). Os resultados representam a média ± epm da LDH libertada na presença do Win 5 µM, correspondente a 3 experiências (n=3), expressa em termos de % do ensaio controlo correspondente. Observou-se redução estatisticamente significativa ($P<0,05$), entre (C.A.+Win 5 µM)/C.A. e (C.A.+Win 5 µM+Ado 30 µM)/(C.A.+Ado 30 µM) (ANOVA seguida de teste de Tukey)

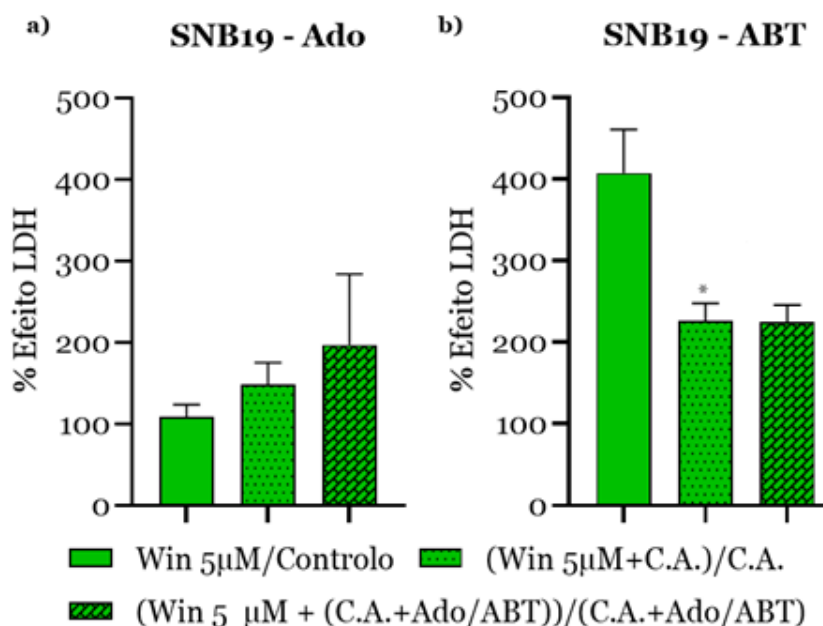


Figura 43 – Influência da Ado (a) e do ABT (b) no efeito do Win 5 µM na libertação de LDH, para a linha SNB19. As células foram incubadas durante 72h na presença de Win 5 µM, de veículo (controlo), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Win 5 µM, de C.A.+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM) ou de C.A.+Win 5 µM+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM). Os resultados representam a média ± epm da LDH libertada na presença do Win 5 µM, correspondente a 3 experiências (n=3), expressa em termos de % do ensaio controlo correspondente. Observou-se redução estatisticamente significativa ($P<0,03$), entre (C.A.+Win 5 µM)/C.A. e (C.A.+Win 5 µM+ABT 30 µM)/(C.A.+ABT 30 µM) e entre (C.A.+Win 5 µM)/C.A. e Win 5 µM/Controlo (ANOVA seguida de teste de Tukey)

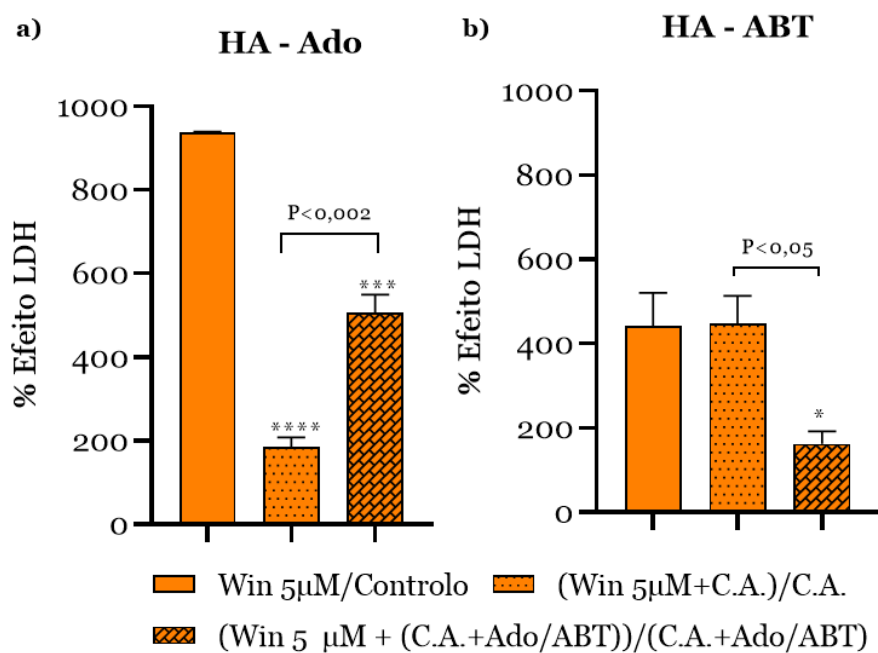


Figura 44 – Influência da Ado (a) e do ABT (b) no efeito do Win 5 µM na libertação de LDH, para os HA. As células foram incubadas durante 72h na presença de Win 5 µM, de veículo (controlo), de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado (C.A.), de C.A.+Win 5 µM, de C.A.+(Ado 30 µM ou ABT 30 µM) ou de C.A.+Win 5 µM+ (Ado 30 µM ou ABT 30 µM). Os resultados representam a média ± epm da LDH libertada na presença do Win 5 µM, correspondente a 3 experiências (n=3), expressa em termos de % do ensaio controlo correspondente. a) Observou-se redução estatisticamente significativa de (C.A.+Win 5 µM)/C.A. e (C.A.+Win 5 µM+Ado 30 µM)/(C.A.+Ado 30 µM) em relação a Win 5 µM/Controlo (****P<0,0001; ***P<0,001). b) Observou-se redução estatisticamente significativa (*P<0,05) entre (C.A.+Win 5 µM)/C.A. e (C.A.+Win 5 µM+Ado 30 µM) (ANOVA seguida de teste de *Tukey*).

4 Avaliação do efeito do aumento da concentração da adenosina na expressão de CB1

4.1 Expressão do recetor CB1 nas diferentes linhas de GBM e HA

4.1.1 PCR convencional

A técnica de PCR convencional permitiu confirmar a expressão do recetor CB1 dos canabinóides nas diferentes linhas de GBM (U373, U87 e SNB19) e nos HA. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com *GreenSafe* (NZYTech) tal como descrito na secção de Métodos, Capítulo B. Através dos resultados apresentados na figura 45, e por comparação com o marcador de peso molecular *NZY DNA Ladder VI* (NZYtech), confirmou-se que os fragmentos obtidos correspondiam ao tamanho esperado (140 pb). O controlo negativo (CN) não amplificou indicando ausência de contaminações. Testou-se os 60°C, como temperatura de *annealing*, e observou-se uma nítida expressão de CB1 nas três linhas de GBM e nos HA, na banda dos 140 pb, tal como esperado.

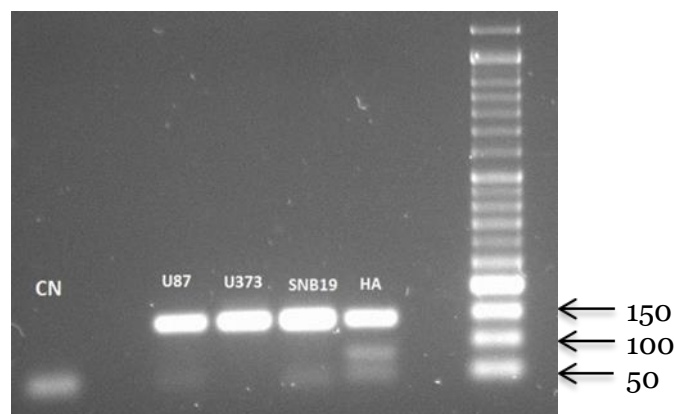


Figura 45 – Eletroforese em gel de agarose 2% corado com *GreenSafe* dos produtos de PCR do cDNA utilizando um par de *primers* específicos para o gene do recetor CB1. Na imagem, da esquerda para a direita, esta representado o controlo negativo (CN); os fragmentos relativos ao gene CB1 (140pb), para cada tipo de células (U373; U87; SNB19 e HA) e o marcador de peso molecular *NZYDNA Ladder V* (NZYtech).

4.1.2 PCR em tempo Real

O RT-PCR teve por finalidade avaliar as diferentes expressões do gene CB1 nas três linhas de GBM e nos HA. Utilizou-se a *B-actina* como gene *housekeeping*, para normalizar os níveis de expressão do gene CB1. Foram construídas as curvas de eficiência para cada gene (*B-actina* e CB1) tendo-se obtido uma eficiência dos *primers* entre 95% a 105%.

Avaliou-se a expressão do gene CB1 em células de GBM e HA, tratadas com três condições diferentes: controlo, Ado 30 μM e ABT 15 μM .

Nas figuras 46 a 49 são apresentados os valores de expressão do mRNA do gene do recetor CB1 para cada tipo de linha de GBM (U373, U87 e SNB19) e dos HA, obtidos em cada condição. A figura 46, referente às células U373, mostra que na presença de Ado 30 μM a expressão do gene CB1 é superior à expressão obtida na presença de, embora os níveis de expressão do recetor CB1 tanto na presença de Ado 30 μM como de ABT 15 μM não diferiram significativamente do controlo. Na linha U87, figura 47, o perfil é totalmente diferente das restantes células. Neste caso na presença de ABT existe uma redução da expressão do gene CB1, enquanto que na presença de Ado se observa apenas uma tendência para redução da expressão do recetor CB1 embora esta não seja estatisticamente significativa. Quanto à linha SNB19 e aos HA, não se observou diferença nos níveis de expressão do recetor CB1 entre nenhuma das condições analisadas.

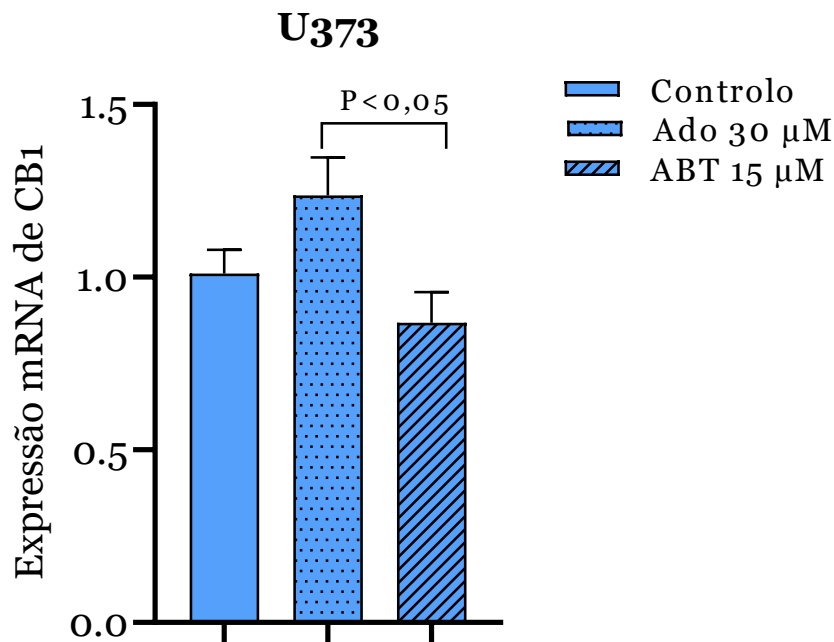


Figura 46 – Efeito da Ado (30 μM) e do ABT (15 μM) nos níveis de expressão do mRNA do gene do recetor CB1 na linha U373. As células foram incubadas durante 72h na presença de veículo (controlo), de Ado (30 μM) ou de ABT (15 μM). Os resultados representam a média ± epm, de 3 experiências (n=3) da expressão do mRNA do recetor CB1 normalizada para a expressão do mRNA da β -actina, considerando a condição controlo como referência. A expressão do gene CB1 apresenta diferença significativa entre Ado e ABT ($P < 0,05$), mas não apresenta diferenças significativas em relação ao controlo (ANOVA seguida de teste de Tukey).

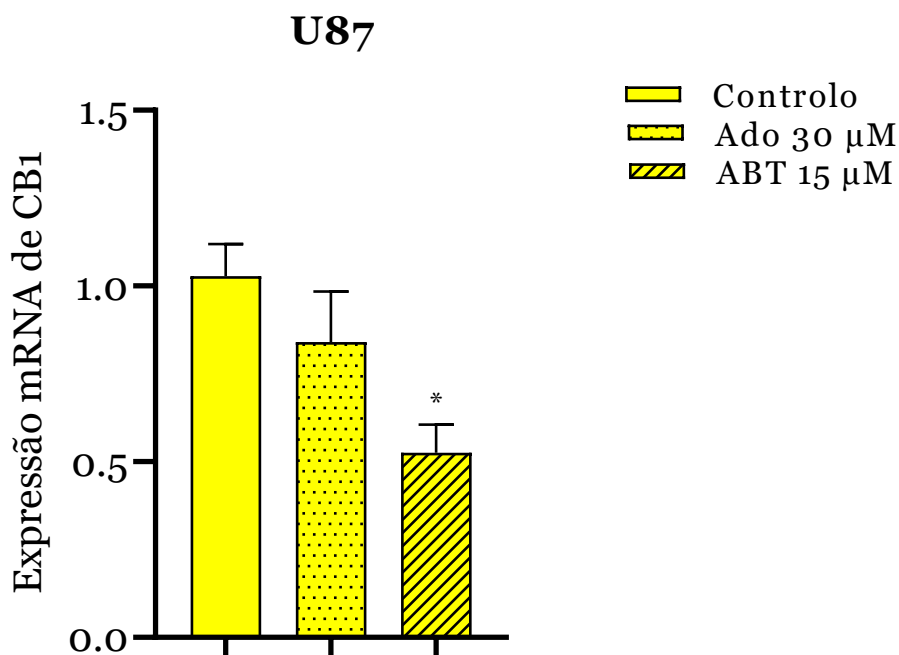


Figura 47 – Efeito da Ado (30 μM) e do ABT (15 μM) nos níveis de expressão do mRNA do gene do recetor CB1 na linha U87. As células foram incubadas durante 72h na presença de veículo (controlo), de Ado (30 μM) ou de ABT (15 μM). Os resultados representam a média ± epm, de 3 experiências (n=3) da expressão do mRNA do recetor CB1 normalizada para a expressão do mRNA da β -actina, considerando a condição controlo como referência. A expressão do gene CB1 apresenta diferença significativa do ABT em relação ao controlo (* $P < 0,05$) (ANOVA seguida de teste de Tukey).

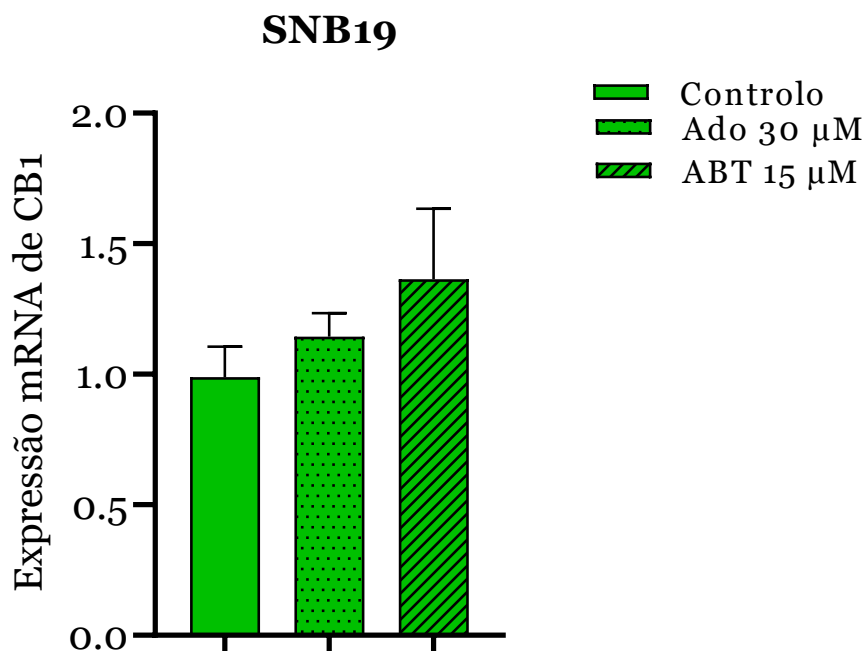


Figura 48 – Efeito da Ado (30 μ M) e do ABT (15 μ M) nos níveis de expressão do mRNA do gene do recetor CB1 na linha SNB19. As células foram incubadas durante 72h na presença de veículo (controlo), de Ado (30 μ M) ou de ABT (15 μ M). Os resultados representam a média \pm epm, de 3 experiências (n=3) da expressão do mRNA do recetor CB1 normalizada para a expressão do mRNA da β -actina, considerando a condição controlo como referência. Não se observou diferenças estatisticamente significativas entre as condições (ANOVA seguida de teste de Tukey).

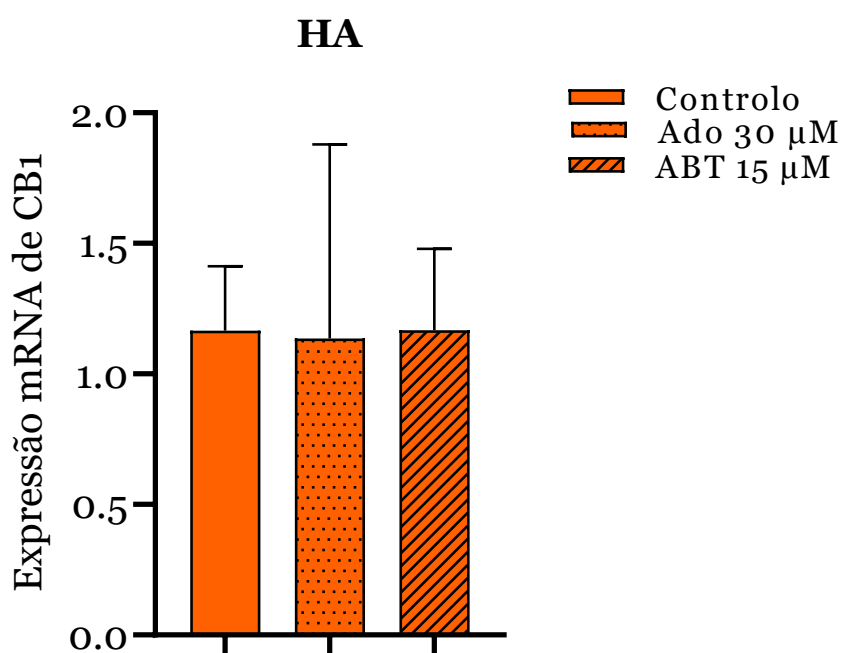


Figura 49 – Efeito da Ado (30 μ M) e do ABT (15 μ M) nos níveis de expressão do mRNA do gene do recetor CB1 nos HA. As células foram incubadas durante 72h na presença de veículo (controlo), de Ado (30 μ M) ou de ABT (15 μ M). Os resultados representam a média \pm epm, de 3 experiências (n=3) da expressão do mRNA do recetor CB1 normalizada para a expressão do mRNA da β -actina, considerando a condição controlo como referência. Não se observou diferenças estatisticamente significativas entre as condições (ANOVA seguida de teste de Tukey).

Capítulo D

Discussão

O GBM, astrocitoma de grau IV, com elevada capacidade infiltrativa, grande heterogeneidade celular e alta proliferação (Torres *et al.*, 2016) é o tumor mais agressivo do SNC (Anjum *et al.*, 2017; Gussyatine and Hegi, 2018), com uma taxa de letalidade elevada, resistência à terapêutica sendo atualmente incurável (Aldape *et al.*, 2015). A ineficácia das metodologias de tratamento disponíveis fazem com que seja necessário avaliar métodos novos que utilizem singularidades das células de GBM.

As células de GBM possuem recetores de canabinóides (em particular o CB1), os quais têm a capacidade de induzir a redução da proliferação celular quando expostos à ação dos canabinóides (Le Boisselier *et al.*, 2017), tais como Win 55 212-2 - agonista sintético não seletivo dos recetores dos canabinóides, o qual demonstrou capacidade de suprimir o crescimento celular e bloquear a progressão do ciclo celular de gliomas (Massi *et al.*, 2004; McAllister *et al.*, 2005).

Algumas ações anti-tumorais dos recetores CB1 em gliomas envolvem alterações epigenéticas, nomeadamente metilação das histonas (D'Addario *et al.*, 2013), por outro lado a expressão do gene dos recetores CB1 pode ser regulada por metilação da sua região promotora. Uma vez que a Ado acumula-se em regiões de hipoxia, presentes em GBM, e pode induzir hipometilação do DNA ao interferir com a ação das metiltransferases dependentes de SAM (Boison *et al.*, 2002), colocou-se a hipótese de elevados níveis de Ado poderem interferir com a expressão ou a ação anti-tumoral dos canabinóides em GBM, o que foi investigado no seguinte trabalho. Numa fase inicial foram tratadas as linhas celulares de GBM com uma gama de diferentes concentrações de Win, previamente selecionadas. Foi possível observar um perfil de comportamento idêntico para as três linhas celulares evidenciando em todas que as duas concentrações mais baixas testadas (0,1 μM e 1 μM) eram ineficazes em reduzir a viabilidade/proliferação celular, ao contrário das três concentrações mais elevadas (5 μM , 15 μM e 30 μM) que reduziam significativamente a proliferação, em particular as duas concentrações mais elevadas produziram uma quase total inibição da proliferação celular. A análise das curvas Dose-Resposta permitiu o cálculo dos EC_{50} , a concentração do composto para qual 50% do efeito foi observado, permitindo constatar que para as diferentes linhas os valores de EC_{50} estavam compreendidos no mesmo intervalo de concentrações de 2,2 a 2,8 μM , enquanto que para os HA foi obtido um valor de 1,5 μM , próximo dos valores obtidos para as linhas. Desta forma escolheu-se a

concentração de Win de 5 μ M para realização das experiências posteriores, uma vez que esta concentração produziu uma inibição da viabilidade/proliferação celular ligeiramente superior a 50%.

Para avaliação da influência do aumento da concentração de Ado no efeito inibitório do Win na viabilidade/proliferação celular, o efeito do Win 5 μ M, foi estudado quer na ausência quer na presença de um *cocktail* de antagonistas dos recetores de Ado (C.A.) para estudar se a resposta de Ado era ou não via recetores. Formou-se dois grupos de estudo: um realizado na presença de ABT, com a finalidade de inibir a ADK e assim aumentar os níveis endógenos de Ado; e o outro na presença de Ado exógena que provoca um efeito transitório dos níveis de Ado devido à sua rápida metabolização. Para compensar a rápida metabolização da Ado exógena, esta era adicionada de 8 em 8 horas.

Os resultados mostraram que a adição de Ado exógena não modificou a proliferação/viabilidade celular em nenhuma das linhas de GBM estudadas, ao contrário dos astrócitos em que esta diminuiu a proliferação/viabilidade celular. A ausência de efeito da Ado exógena nas linhas, provavelmente é consequência de um aumento do metabolismo desta nas linhas comparativamente aos HA. De facto está descrito um aumento da expressão da ADK no GBM comparativamente a HA (de Groot *et al.*, 2012).

Sendo assim, se se inibir a metabolização da Ado pela ADK, com o consequente aumento da Ado endógena, seria de esperar que a proliferação/viabilidade celular nas linhas de GBM também fosse afetada. De facto, observou-se uma diminuição induzida pelo ABT na proliferação/viabilidade celular nas três linhas estudadas bem como nos HA, mesmo quando os recetores da Ado estavam bloqueados. Estes resultados sugerem que o efeito do aumento da Ado endógena na proliferação/viabilidade celular não é mediado por ativação dos recetores da Ado e que envolverá provavelmente a inversão da reação catalisada pela hidrolase da SAH, com consequente aumento da concentração de SAH e inibição das metiltransferases de pendentos de SAM, tal como foi observado recentemente pelo nosso grupo em HA (Marcelino *et al.*, 2019). Avaliou-se então se o aumento da Ado endógena afetaria o efeito do Win na proliferação/viabilidade celular.

De facto observou-se que a presença de ABT atenuou o efeito do Win na proliferação/viabilidade celular nas 3 linhas de GBM estudadas bem como nos HA, e que esta atenuação não é mediada pelos recetores da Ado pois foi observada quando os recetores estavam bloqueados pelo C.A. Quanto à adição de Ado exógena, esta só atenuou o efeito do Win na proliferação/viabilidade celular nas células U373. A atenuação induzida pelo aumento da concentração de Ado no efeito

do Win na proliferação/viabilidade celular poderá ser mediada, pelo menos em parte, por diminuição da expressão dos recetores CB1 dos canabinóides nas células U87, mas não nos restantes tipos de células estudados onde o aumento da concentração de Ado não modificou a expressão do mRNA dos recetores CB1.

De referir que a presença de *cocktail* de antagonistas dos recetores da Ado por si só diminuiu a proliferação/viabilidade celular nas células U373, SNB19 e HA, mas não nas células U87. Contudo, a presença de C.A. por si só não modificou o efeito do Win na proliferação/viabilidade celular em nenhum dos tipos de células estudados. A presença de ABT atenuou o efeito do Win na proliferação/viabilidade celular nas três linhas de GBM estudadas bem como nos HA

Para complementar o estudo da proliferação avaliou-se a citotoxicidade do Win 5 μ M e dos restantes compostos em análise através da quantificação da LDH libertada. Nem o ABT nem a Ado produziram citotoxicidade em nenhuma das linhas de GBM estudadas, à semelhança do C.A. que não afetou nem a proliferação nem a morte das células. Quanto aos HA, embora a adição de Ado exógena não tenha produzido citotoxicidade, a presença de ABT aumentou a libertação de LDH. Os resultados sugerem que a diminuição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo ABT nas linhas e pela Ado nos HA, observada no ensaio do MTT, não reflete um aumento da citotoxicidade e será provavelmente consequência de diminuição da proliferação celular.

O Win 5 μ M para além de reduzir a proliferação também produziu citotoxicidade quer nas células de GBM quer nos HA. A presença de ABT produziu uma atenuação da citotoxicidade induzida pelo Win apenas na linha U87 e nos HA, mas não nas linhas U373 e SNB19, sendo essa atenuação observada mesmo quando os recetores da Ado estão bloqueados pelo *cocktail* de antagonistas. No entanto, no caso dos HA, a adição de Ado exógena produziu o efeito contrário ao ABT, aumentando a citotoxicidade induzida pelo Win. Os resultados sugerem que a atenuação pelo ABT do efeito inibitório do Win na viabilidade/proliferação celular nas linhas e nos HA, observada no ensaio do MTT, reflete pelo menos em parte uma atenuação da citotoxicidade induzida pelo Win nas células U87 e HA, mas não nas células U373 e SNB19.

Capítulo E

Conclusão

O trabalho de investigação desenvolvido para a elaboração desta dissertação permitiu comprovar o efeito anti proliferativo dos canabinóides, particularmente do Win, em modelos *in vitro* de GBM, para concentrações iguais ou superiores a 5 μM . Foi igualmente perceptível que este canabinóide sintético afeta de igual modo os astrócitos humanos normais.

O efeito do Win é reduzido na presença de elevadas concentrações endógenas de Ado, sendo que este efeito não é mediado pelos recetores de Ado. Além da redução da proliferação celular o Win também provoca a morte das células de GBM, demonstrando eficácia como uma possível terapia.

Em especial para as U87 observou-se que na presença de ABT ocorre a redução significativa da expressão do CB1, o que neste caso poderá explicar, pelo menos em parte, o facto de que o efeito do Win seja atenuado quando o ABT está presente.

Numa perspetiva futura, será importante tentar reproduzir as observações efetuadas os estudos *in vitro* para estudos *in vivo*, recorrendo a modelos animais de GBM, para tentar perceber se o Win influencia a progressão tumoral e se é modulado por elevadas concentrações de Ado.

Capítulo F

Referências Bibliográficas

Aguado T., Carracedo A., Julien B., Velasco G., Milman G., Mechoulam R., Alvarez L., Guzmán M. and Galve-Roperh I. (2007). Cannabinoids Induce Glioma Stem-like Cell Differentiation and Inhibit Gliomagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 282: 6854–6862. Doi 10.1074/jbc.M608900200.

Aldape K., Zadeh G., Mansouri S., Reifenberger G. and von Deimling A. (2015). Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica* 129: 829-48. Doi: 10.1007/s00401-015-1432-1.

Anjum K., Shagufta B.I., Abbas S.Q., Patel S., Khan I., Shah S.A.A., Akhter N. and Hassan S.S.U. (2017). Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 92: 681-689. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.125.

Banan R. and Hartmann C. (2017). The new WHO 2016 classification of brain tumors- what neurosurgeons need to know. *Acta Neurochirurgica* 159: 403-418. Doi: 10.1007/s00701-016-3062-3.

Bastien J.I., McNeill K.A. and Fine H.A. (2015). Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer* 121: 502-16. Doi: 10.1002/cncr.28968.

Boison D., Scheurer L., Zumsteg V., Rüllicke T., Litynski P., Fowler B., Brandner S. and Mohler H. (2002). Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 14: 6985-90. Doi: 10.1073/pnas.092642899.

Burnstock, G. (2013), Introduction to purinergic signalling in the brain, in Barañska J. (ed.), Glioma Signaling. Ed. Cohen, I.R, Lajtha, A., Lambris, J.F. and Paoletti, R. Dordrecht: Springer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 986: 1-12. Doi: 10.1007/978-94-007-4719-7.

Cadieux B., Ching T.T., VandenBerg S.R. and Costello J.F. (2006). Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Research* 66: 8469-76. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1547

Castaneto M.S., Gorelick D.A., Desrosiers N.A., Hartman R.L., Pirard S. and Huestis M.A. (2014). Synthetic cannabinoids: epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence* 144: 12-41. Doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005.

Ceruti, S. and Abbrachio, M.P. (2013), Adenosine Signaling in Glioma Cells, Barańska J. (ed.), Glioma Signaling. Ed. Cohen, I.R, Lajtha, A., Lambris, J.F. and Paoletti, R. Dordrecht: Springer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 986: 13-30. Doi: 10.1007/978-94-007-4719-7.

Costa L., Amaral C., Teixeira N., Correia-da-Silva G. and Fonseca B.M. (2016). Cannabinoid-induced autophagy: Protective or death role?. *Prostaglandins other lipid mediators* 122: 54-63. Doi 10.1016/j.prostaglandins.2015.12.006.

Crespo I., Vital A.L., Gonzalez-Tablas M., Patino Mdel C., Otero A., Lopes M.C., de Oliveira C., Domingues P., Orfao A. and Tabernero M.D. (2015). Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *The American Journal of Pathology* 185: 1820-33. Doi: 10.1016/j.ajpath.2015.02.023.

D'Addario C., Di Francesco A., Pucci M., Finazzi Agro A. and Maccarrone M. (2013). Epigenetic mechanisms and endocannabinoid signalling. *The FEBS Journal* 280: 1905-17. Doi: 10.1111/febs.12125.

Daniele S., Zappelli E., Natali L., Martini C. and Trincavelli M.L. (2014). Modulation of A1 and A2B adenosine receptor activity: a new strategy to sensitise glioblastoma stem cells to chemotherapy. *Cell death & Disease* 5: 1539. Doi: 10.1038/cddis.2014.487.

de Groot M, Iyer A, Zurolo E, Anink J, Heimans JJ, Boison D, Reijneveld JC, Aronica E. (2012). Overexpression of ADK in human astrocytic tumors and peritumoral tissue is related to tumor-associated epilepsy. *Epilepsia* 53, 58-66. Doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03306.x

De Jesús M.L., Hostalot C., Garibi J.M., Sallés J., Meana J.J. and Callado L.F. (2010) Opposite changes in cannabinoid CB1 and CB2 receptor expression in human gliomas. *Neurochemistry International* 56: 829-33. Doi: 10.1016/j.neuint.2010.03.007.

DeBerardinis R.J. and Chandel N.S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* 2: 5. Doi: 10.1126/sciadv.1600200.

- Drury A.N. and Szent-Gyorgyis. (1929). The Physiological Activity of Adenine Coumpounds with Especial Reference to Their action upon the Mammalian Heart. *The Journal Physiology* 68: 213–237. Doi: 10.1113/jphysiol.1929.sp002608.
- Dumitru C.A., Sandalcioğlu I.E. and Karsak M. (2018). Cannabinoids in Glioblastoma Therapy: New Applications for Old Drugs. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11: 159. Doi: 10.3389/fnmol.2018.00159.
- Echigo R., Sugimoto N., Yachie A. and Ohno-Shosaku T. (2012). Cannabinoids inhibit peptidoglycan-induced phosphorylation of NF- κ B and cell growth in U87MG human malignant glioma cells. *Oncology Reports* 28: 1176-80. Doi: 10.3892/or.2012.1937.
- Ellert-Miklaszewska A., Kaminska B. and Konarska L. (2005). Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cellular Signalling* 17: 25-37. Doi 10.1016/j.cellsig.2004.05.011.
- Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews* 53: 527-552.
- Gessi S., Sacchetto V., Fogli E., Merighi S., Varani K., Baraldi P.G., Tabrizi M.A., Leung E., MacLennan S., Borea P.A (2010). Modulation of metalloproteinase-9 in U87MG glioblastoma cells by A₃ adenosine receptors. *Biochemical Pharmacology* 79: 1483-95. Doi: 10.1016/j.bcp.2010.01.009
- Ghiringhelli F., Bruchard M., Chalmin F. and Rébé C. (2012). Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 473712. Doi: 473712 doi:10.1155/2012/473712.
- Grayson M. (2015). Cannabis. *Nature* 525; 7570. Doi: 10.1038/525S1a.
- Gusyatiner O. and Hegi M.E. (2018). Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Seminars in Cancer Biology* 51: 50-58. Doi: 10.1016/j.semcancer.2017.11.010.
- Hanif F., Muzaffar K., Perveen K., Malhi S.M. and Simjee Sh.U. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 18: 3-9. Doi 10.22034/APJCP.2017.18.1.3.

Ivanov V.N., Wu J. and Hei T.K. (2017). Regulation of human glioblastoma cell death by combined treatment of cannabidiol, γ -radiation and small molecule inhibitors of cell signaling pathways. *Oncotarget* 8: 74068–74095. Doi: 10.18632/oncotarget.18240.

Kros J.M., Mustafa D.M., Dekker L.J., Sillevs Smitt P.A., Luider T.M. and Zheng P.P. (2015). Circulating glioma biomarkers. *Neuro-Oncology* 17: 343-60. Doi: 10.1093/neuonc/nou207.

Le Boisselier R., Alexandre J., Lelong-Boulouard V. and Debruyne D. (2017). Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. *Clinical pharmacology and therapeutics* 101: 220-229. Doi: 10.1002/cpt.563.

Liu T.Z., Wang X., Bai Y.F., Liao H.Z., Qiu S.C., Yang Y.Q., Yan X.H., Chen J., Guo H.B. and Zhang S.Z. (2014). The HIF-2 α dependent induction of PAP and adenosine synthesis regulates glioblastoma stem cell function through the A2B adenosine receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 49:8-16. Doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.007.

Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W. and Kleihues P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* 114: 97-109. Doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.

Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P. and Ellison D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 131: 803-20. Doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.

Malmir H., Shayanfar M., Mohammad-Shirazi M., Tabibi H., Sharifi G. and Esmailzadeh A. (2018). Patterns of nutrients intakes in relation to glioma: A case-control study. *Clinical Nutrition* 18: 1-8. Doi: 10.1016/j.clnu.2018.06.961.

Marcelino H, Nogueira VC, Santos CRA, Quelhas P, Fonseca-Gomes J, Tomás J, Diógenes MJ, Sebastião AM, Cascalheira JF. (2019). Adenosine inhibits human astrocyte proliferation independently of adenosine receptor activation. *Journal of Neurochemistry* 153:455-467. Doi: 10.1111/jnc.14937.

Marieb EN and Hoehn K. (2007). Human anatomy & physiology. Pearson Education.

- Massi P., Vaccani A., Ceruti S., Colombo A., Abbracchio M.P. and Parolaro D. (2004). Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308: 838-45. Doi: 10.1124/jpet.103.061002.
- McAllister S.D., Chan C., Taft R.J., Luu T., Abood M.E., Moore D.H., Aldape K. and Yount G. (2005). Cannabinoids selectively inhibit proliferation and induce death of cultured human glioblastoma multiforme cells. *Journal of Neuro-Oncology* 74: 31-40. Doi: 10.1007/s11060-004-5950-2.
- Mills B., Yepes A. and Nugent K. (2015). Synthetic Cannabinoids. *The American Journal of the Medical Sciences* 350: 59-62. Doi: 10.1097/MAJ.0000000000000466.
- Motaln H., Koren A., Gruden K., Ramšak Ž., Schichor C. and Lah T.T. (2015). Heterogeneous glioblastoma cell cross-talk promotes phenotype alterations and enhanced drug resistance. *Oncotarget* 6: 40998-1017. Doi: 10.18632/oncotarget.5701.
- Mouro F.M., Köfalvi A., André L.A., Baqi Y., Müller C.E., Ribeiro J.A. and Sebastião A.M. (2019). Memory deficits induced by chronic cannabinoid exposure are prevented by adenosine A2AR receptor antagonism. *Neuropharmacology*, 1: 10-21. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.05.003
- Mutafova-Yambolieva V.N. and Durnin L. (2014). The purinergic neurotransmitter revisited: a single substance or multiple players. *Pharmacology & Therapeutics* 144: 162-91. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.05.012.
- Ortega A., Rangel-López E., Hidalgo-Miranda A., Morales A., Ruiz-García E., Meneses-García A., Herrera-Gómez A., Aguilar-Ponce J.L., González-Herrera I.G., Guevara-Salazar P., Prospero-García O. and Del Angel S.A. (2015). On the effects of CP 55-940 and other cannabinoid receptor agonists in C6 and U373 cell lines. *Toxicology in Vitro* 29: 1941-51. Doi: 10.1016/j.tiv.2015.08.003.
- Ostrom Q.T., Gittleman H., Stetson L., Virk S. and Barnholtz-Sloan J.S. (2018). Epidemiology of Intracranial Gliomas. *Progress in Neurological Surgery* 30:1-11. Doi: 10.1159/000464374.
- Phillis J.W. and Wu P.H. (1981). The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Progress in Neurobiology* 16: 187-239. Doi: 0301-0082/81/1001 0187\$05.00/0.

Pinto, A. (2016). A *Cannabis sativa* L. e as suas aplicações em oncologia – Que futuro? (Monografia de Estágio Curricular). Universidade de Coimbra, Portugal.

Quezada C, Garrido W, Oyarzún C, Fernández K, Segura R, Melo R, Casanello P, Sobrevia L, San Martín R.(2013). 5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. *Journal of Cellular Physiology* 8:602-8. Doi: 10.1002/jcp.24168

Rathbone M.P., Middlemiss P.J., Gysbers J.W., DeForge S., Costello P., Del Maestro R.F. (1992). Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 28A(7-8):529-36.

Ribeiro F.F., Xapelli S., Miranda-Lourenço C., Tanqueiro S.R., Fonseca-Gomes J., Diógenes M.J., Ribeiro J.A. and Sebastião A.M. (2016). Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology* 104: 226-42. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.11.006.

Salazar M., Carracedo A, Salanueva I.J., Hernandez-Tiedra S., Lorente M., Egia A., Vazquez P., Blazquez C., Torres S., Garcia S., Nowak J., Fimia G.M., Piacentini M., Cecconi F., Pandolfi P.P., Gonzalez-Feria L., Iovanna J.L., Guzman M., Boya P. and Velasco G. (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *Journal of Clinical Investigation* 119: 1359-1372. Doi: 10.1172/JCI37948.

Sheng W.S., Hu S., Min X., Cabral G.A., Lokensgard J.R. and Peterson P.K. (2004). Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia* 15: 211-9. Doi: 10.1002/glia.20108.

Thakkar J.P., Dolecek T.A., Horbinski C., Ostrom Q.T., Lightner D.D., Barnholtz-Sloan J.S. and Villano J.L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 23: 1985-96. Doi 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275.

Torres A., Vargas Y., Uribe D., Jaramillo C., Gleisner A., Salazar-Onfray F., López M.N., Melo R., Oyarzún C., San Martín R. and Quezada C. (2016). Adenosine A₃ receptor elicits chemoresistance mediated by multiple resistance-associated protein-1 in human glioblastoma stem-like cells. *Oncotarget* 7: 67373-67386. Doi: 10.18632/oncotarget.12033.

Torres Á., Erices J.I., Sanchez F., Ehrenfeld P., Turchi L., Virolle T., Uribe D., Niechi I., Spichiger C., Rocha J.D., Ramirez M., Salazar-Onfray F., San Martín R., Quezada C. (2019). Extracellular adenosine promotes cell migration/invasion of Glioblastoma Stem-like Cells through A₃ Adenosine Receptor activation under hypoxia. *Cancer Letters*. 446: 112-122. Doi: 10.1016/j.canlet.2019.01.004.

Torres, S., Lorente, M., Rodriguez-Fornes, F., Hernandez-Tiedra, S., Salazar, M., GarciaTaboada, E., Barcia, J., Guzman, M., Velasco, G. (2011). A combined preclinical therapy of cannabinoids and temozolomide against glioma. *Molecular Cancer Therapeutics* 10, 90–103. Doi: 10.1158/1535-7163.mct-10-0688.

Urbańska K. and Mandal C.C. (2014). Advanced Views of Glioblastoma Multiforme U-87 Cells for Therapy of Brain Tumor. *International Journal of Clinical Biochemistry and Research* 1: 59-66

Uribe D., Torres A., Rocha J.D., Niechi I., Oyarzún C., Sobrevia L., San Martín R. and Quezada C. (2017). Multidrug resistance in glioblastoma stem-like cells: Role of the hypoxic microenvironment and adenosine signaling. *Molecular Aspects of Medicine* 55: 140-151. Doi: 10.1016/j.mam.2017.01.009.

Valdés F.Z., Luna V.Z., Arévalo B.R., Brown N.V. and Gutiérrez M.C. (2018). Adenosine: Synthetic Methods of Its Derivatives and Antitumor Activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 18: 1684-1701. Doi: 10.2174/1389557518666180516163539.

Velasco G., Galve-Roperh I., Sánchez C., Blázquez C., Haro A. and Guzmán M. (2005). Cannabinoids and ceramide: two lipids acting hand-by-hand. *Life Sciences* 77: 1723-31. Doi 10.1016/j.lfs.2005.05.015.

Wang W., Fridman A., Blackledge W., Connelly S., Wilson I.A., Pilz R.B. and Boss G.R. (2009). The phosphatidylinositol 3-kinase/akt cassette regulates purine nucleotide synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 3521–3528. Doi: 10.1074/jbc.M806707200.

Wang X., Yang K., Xie Q., Wu Q., Mack S.C., Shi Y., Kim L.J.Y., Prager B.C., Flavahan W.A., Liu X., Singer M., Hubert C.G., Miller T.E., Zhou W., Huang Z., Fang X., Regev A., Suvà M.L., Hwang T.H., Locasale J.W., Bao S. and Rich J.N. (2017). Purine synthesis promotes maintenance of brain tumor initiating cells in glioma. *Nature Neuroscience* 20: 661-673. Doi: 10.1038/nn.4537.

Welch W.C., Morrison R.S., Gross J.L., Gollin S.M., Kitson R.B., Goldfarb R.H., Giuliano K.A., Bradley M.K. and Kornblith P. (1995). Morphologic, immunologic, biochemical, and cytogenetic characteristics of the human glioblastoma-derived cell line, SNB-19. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 31: 610-616. Doi: 10.1007/BF02634314.

Williams-Karnesky R.L., Sandau U.S., Lusardi T.A., Lytle N.K., Farrell J.M., Pritchard E.M., Kaplan D.L. and Boison D. (2013). Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 123: 3552-63. Doi: 10.1172/JCI65636.

Yan A., Joachims M.L., Thompson L.F., Miller A.D., Canoll P.D., Bynoe M.S. (2019). CD73 Promotes Glioblastoma Pathogenesis and Enhances Its Chemoresistance via A2B Adenosine Receptor Signaling. *The Journal of Neuroscience*. 39: 4387-4402 Doi: 10.1523/JNEUROSCI.1118-18.2019