



# **Análise da expressão do OR51E2 no Glioblastoma Multiforme**

**Joana Rita Bichinho Pinto**

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

Orientador: Prof. Doutora Cecília Santos  
Co-orientador: Prof. Doutora Isabel Gonçalves

**junho de 2021**



## **Dedicatória**

Sem dúvidas, nem incertezas. Sempre soube a quem dedicar este trabalho. Pelo que foste, pelo que me deste, pelo que me ensinaste. A ti, madrinha. A ti, Cristina.



## Agradecimentos

Sempre me perguntei como seria agradecer a todas as pessoas que contribuíram não só para o desenvolvimento deste projeto, mas também para o meu desenvolvimento introspectivo e pessoal.

Expresso o meu profundo agradecimento, à Professora Doutora Cecília Santos, pela orientação, profissionalismo e disponibilidade. Obrigada pela grande oportunidade que me deu de ingressar no seu Grupo de Investigação e pela a confiança que depositou em mim em todas as fases do projeto.

À Professora Doutora Isabel Gonçalves, pela simpatia, sugestões e total disponibilidade que sempre revelou para comigo.

À fonte de financiamento "Desafios interdisciplinares em Neurodegeneração (ICON)" (ref.<sup>a</sup> CENTRO-01-0145-FEDER-000013), cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional do Centro, a decorrer no CICS-UBI, um especial obrigada.

Um obrigado à Ana Catarina Duarte, por tudo o que fez por mim. Uma pessoa pela qual tenho muita estima, que me acompanhou desde o primeiro dia, tanto nos bons momentos como nos de maior aflição. Agradeço todos os conhecimentos e conversas que me proporcionou.

Quero também agradecer à Ana Raquel Costa, pelo acompanhamento, conhecimento e enorme apoio que sempre me deu, ao longo deste ano, em especial nesta fase final.

Aos restantes membros do grupo *Complexus*, pela ajuda, conhecimento e companheirismo.

Ao Doutor Isidro Ferrer (IBIDELL, Barcelona) pela cedência dos cortes histológicos. À técnica de Anatomia Patológica da FCS, Catarina Ferreira, pela realização das imunohistoquímica e à Ana Raquel Costa pela aquisição das respetivas imagens.

Aos meus melhores amigos, por todo o apoio, carinho e paciência. Aos meus Pais, que são tudo para mim. Um obrigado nunca será suficiente por tudo o que fazem, diariamente, por mim. Espero que possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e amor que me oferecem.



## Resumo

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor maligno, do cérebro e do sistema nervoso central, mais comum. A remoção cirúrgica destes tumores, seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolomida, constituem a abordagem terapêutica mais usada no tratamento do GBM. No entanto, devido à sua agressividade, a esperança média de vida destes doentes é de, aproximadamente, 15 a 18 meses após o diagnóstico e, mesmo em condições favoráveis, a maioria dos pacientes não ultrapassa os 2 anos. Assim, um conhecimento mais aprofundado deste tipo de tumor e a identificação de alvos terapêuticos alternativos são necessários para melhorar o prognóstico e as taxas de sobrevivência dos pacientes. O GBM tem características metabólicas particulares. Tal como na maioria das células cancerígenas, a glicólise prevalece sobre a fosforilação oxidativa como principal fonte de energia, mesmo quando há oxigénio disponível. Essa alteração metabólica designada por *Efeito de Warburg*, favorece a grande demanda de nucleótidos, aminoácidos e lípidos essenciais para a proliferação celular. Assim, a reversão deste efeito surge como uma abordagem terapêutica promissora no tratamento do GBM. Dados recentes, obtidos a partir de ensaios de *microarrays* e sequenciação de RNA de GBM, sugerem que estes tumores expressam o recetor olfativo 51E2 (OR51E2), sendo o lactato, um dos produtos da glicólise, um dos ligandos conhecidos deste recetor. Uma vez que o OR51E2, tem sido implicado na modulação da proliferação e invasão noutros tumores, este trabalho pretende investigar a possibilidade do OR51E2 funcionar como sensor de lactato no microambiente tumoral e, desta forma, modelar o metabolismo e reverter o *Efeito de Warburg*. Os resultados deste estudo confirmaram a expressão do mRNA e da proteína do OR51E2 numa linha de astrócitos normais HASTR/ci35 e em três linhas de GBM, U-87MG, SNB-19 e U-373MG. Procedeu-se também à comparação dos níveis de expressão do OR51E2 em amostras humanas de astrocitomas de diferentes graus (I-IV). Verificou-se que o OR51E2 é expresso, predominantemente, no citosol nas linhas celulares SNB-19 e U-373MG. Assim, a linha SNB-19 foi usada para os restantes ensaios. De acordo com o que seria expectável, as SNB-19, quando sujeitas à privação de oxigénio e glucose, sofrem uma diminuição na viabilidade celular. Para avaliar o possível envolvimento na resposta destas células à hipoxia, o OR51E2 foi silenciado com siRNA. Os resultados obtidos mostraram que o silenciamento do recetor não afeta significativamente a viabilidade celular em condições normais de oxigénio (HG e LG normóxia). Resultados semelhantes foram obtidos sob privação de oxigénio (HG e LG hipóxia). Doseou-se também o lactato extracelular, e não se observaram diferenças significativas entre condições normais de oxigénio (HG e LG normóxia) e de privação de

oxigénio (HG e LG hipóxia). Face aos resultados obtidos concluímos que o OR51E2 não medeia a resposta à hipóxia nesta linha celular de GBM.

## **Palavras-chave**

Glioblastoma multiforme; OR51E2; metabolismo da glucose; hipóxia; proliferação celular.

## Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common malignant tumor of the brain and central nervous system. Surgical removal of these tumors, followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide, are the most used therapeutic approach in the treatment of GBM. However, due to its aggressiveness, the average life expectancy of these patients is approximately 15 to 18 months after diagnosis and, even under favorable conditions, most patients do not exceed 2 years. Thus, a deeper knowledge of this type of tumor and the identification of alternative therapeutic targets are needed to improve the prognosis and survival rates of patients. GBM has particular metabolic characteristics. As in most cancer cells, glycolysis prevails over oxidative phosphorylation as the main source of energy, even when oxygen is available. This metabolic alteration, called the Warburg Effect, favors the great demand for nucleotides, amino acids and lipids essential for cell proliferation. Thus, the reversal of this effect appears as a promising therapeutic approach in the treatment of GBM. Recent data, obtained from microarray assays and GBM RNA sequencing, suggest that these tumors express the olfactory receptor 51E2 (OR51E2), with lactate, one of the products of glycolysis, one of the known ligands of this receptor. Since OR51E2 has been implicated in the modulation of proliferation and invasion in other tumors, this work intends to investigate the possibility of OR51E2 functioning as a lactate sensor in the tumor microenvironment and, in this way, modeling the metabolism and reversing the Warburg Effect. The results of this study confirmed the expression of OR51E2 mRNA and protein in a HASTR/ci35 normal astrocyte line and in three GBM lines, U-87MG, SNB-19 and U-373MG. We also compared the expression levels of OR51E2 in human samples of astrocytomas of different grades (I-IV). It was found that OR51E2 is predominantly expressed in the cytosol in the SNB-19 and U-373MG cell lines. Thus, the SNB-19 line was used for the remaining tests. As expected, SNB-19, when subjected to oxygen and glucose deprivation, suffer a decrease in cell viability. To assess the possible involvement in the response of these cells to hypoxia, OR51E2 was silenced with siRNA. The results obtained showed that receptor silencing does not significantly affect cell viability under normal oxygen conditions (HG and LG normoxia). Similar results were obtained under oxygen deprivation (HG and LG hypoxia). Extracellular lactate was also measured, and no significant differences were observed between normal oxygen conditions (HG and LG normoxia) and oxygen deprivation (HG and LG hypoxia). In view of the results obtained, we conclude that OR51E2 does not mediate the response to hypoxia in this GBM cell line.

## **Keywords**

Glioblastoma multiforme; OR51E2; glucose metabolism; hypoxia; cell proliferation.

# Índice

I. Introdução	1
1.1 Cancro: uma doença multifatorial	2
1.1.1. Sustentação da sinalização proliferativa	3
1.1.2. Inibição dos genes supressores de tumores	3
1.1.3. Resistência à apoptose	4
1.1.4. Ativação da imortalidade replicativa	5
1.1.5. Promoção da angiogénese	5
1.1.6. Invasão e metastização	6
1.1.7. Instabilidade genómica e mutação	8
1.1.8. Inflamação como agente promotor tumoral	9
1.1.9. Evasão ao sistema imunitário	9
1.1.10. Reprogramação do metabolismo energético	10
1.2 Tumores do sistema nervos central	13
1.3 Glioblastoma	14
1.3.1 Estratégias terapêuticas	15
1.3.2 Mecanismos de resistência aos fármacos no glioblastoma	16
1.3.3 Hipóxia e metabolismo	18
1.4 Recetores olfativos no cancro	20
II. Objetivo	23
III. Materiais e métodos	25
3.1 Cultura celular	26
3.1.1 Linhas celulares e condições de cultura	26
3.1.2 Passagem de células	26
3.1.3 Contagem de células	27
3.2 Extração de RNA Total	27
3.3 Síntese de cDNA	28
3.4 PCR da Transcrição Reserva	28
3.5 Imunohistoquímica	29
3.6 Extração de proteína	30
3.7 Western Blotting	30
3.8 Imunocitoquímica	31

3.9	Ensaio de privação de Normóxia e Hipóxia	31
3.10	Ensaio MTT	32
3.11	Silenciamento do OR51E2	32
3.12	Quantificação L-lactato extracelular	33
3.13	Análise estatística	
<b>IV.</b>	<b>Resultados</b>	<b>34</b>
4.1.	O recetor olfativo 51E2 é expresso em células de GBM	35
4.2.	Condições de hipóxia e de baixa concentração de glucose induzem uma redução na viabilidade celular na linha SNB-19	39
4.3.	Silenciamento do OR51E2 na linha celular SNB-19	40
4.4.	Relação entre o silenciamento do OR51E2 e a concentração de lactato extracelular na linha SNB-19	43
<b>V.</b>	<b>Discussão</b>	<b>44</b>
<b>VI.</b>	<b>Conclusão</b>	<b>48</b>
<b>VII.</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>50</b>

## Lista de Acrónimos

ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
BRCA	<i>Breast cancer gene</i> (gene do cancro da mama)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina do soro bovino)
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (adenosina monofosfato cíclica)
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor protein</i> (inibidores de quinases dependentes de ciclinas)
cDNA	Complementary DNA (DNA complementar)
CNGC	<i>Cyclic nucleotide gated channels</i> (canal dependente de nucleótido cíclico seletivo por catião)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i> (Proteína Associada ao Linfócito- T Citotóxico)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Desoxirribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
E2F	<i>Transcription factor E2</i> (fator de transcrição E2)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilendiamino tetra-acético)
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (recetor do fator de crescimento epidérmico)
EMT	<i>Epithelial–mesenchymal transition</i> (transição epitelial-mesenquimal)
FasR	<i>Fas receptor</i> (recetor Fas)
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i> (fator de crescimento de fibroblastos 2)
FO	Fosforilação oxidativa
GBM	Glioblastoma multiforme
GPCRs	<i>G protein-coupled receptors</i> (recetores acoplados à proteína G)
GSCs	Glioblastoma stem cells (células estaminais de GBM)
GST	Genes supressores de tumor
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i> (recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano)
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i> (fator induzido por hipóxia-1 $\alpha$ )
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i> (transcriptase reversa da telomerase)
ICC	Imunocitoquímica

IHC	Imunohistoquímica
LDH	Lactato desidrogenase
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i> (metaloproteinases da matriz)
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic acid</i> (RNA mensageiro)
MTIC	<i>5-(3-methyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide</i> (metildiazónio)
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NK	NK – natural killer cells (células T <i>natural killer</i> )
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Olfactory receptor</i> (recetor olfativo)
P53	Proteína de tumor 53
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i> (Proteína programada 1 da morte celular)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PD-L1	<i>Programmed Cell Death Ligand 1</i> (ligante de morte programado 1)
pRb	Proteína retinoblastoma
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> (homólogo de fosfatase e tensina)
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigénio)
RTKs	<i>Receptor tyrosine kinases</i> (recetores tirosina quinase)
SNC	Sistema nervoso central
TA	Temperatura ambiente
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with 0.1% Tween</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de crescimento transformante beta)
TMZ	Temozolomida
TNFR	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> (recetor do fator de necrose tumoral)
TSP-1	<i>Thrombospondin 1</i> (trombospondina-1)
Tregs	<i>The regulatory T cells</i> (células T-reguladoras)
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>

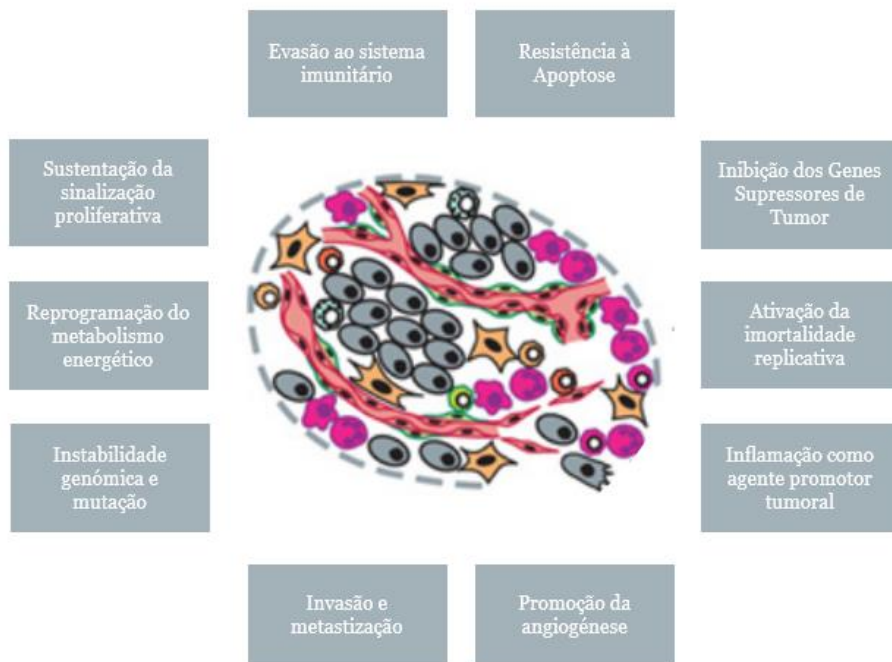
# Introdução

---

# I. Introdução

## 1. Cancro: uma doença multifatorial

Em geral, a formação de um tumor maligno é um processo lento, que se inicia numa única célula, que devido a eventos mutacionais em determinados genes e acumulação de alterações genéticas e epigenéticas, se transforma numa célula cancerígena. O aumento contínuo da incidência e mortalidade por cancro deve-se, principalmente, ao aumento da esperança média de vida, juntamente com a adoção de comportamentos que demonstram ter um papel ativo no desenvolvimento desta doença, como dieta, obesidade, inexistência de exercício físico, exposição a agentes infecciosos e consumo de álcool e tabaco. De acordo com as estimativas do *Globocan*, ocorreram em 2018, 18 milhões de novos casos de cancro e 9.5 milhões de pessoas morreram de cancro no mesmo período [1]. À medida que as células se transformam em células cancerígenas, exibem um conjunto de características e alterações na homeostase (Figura 1), como o escape à morte celular e à atividade do sistema imunológico; alta taxa de proliferação com imortalidade replicativa; reprogramação do metabolismo celular e angiogénese [2-4].



**Figura 1** - Características determinantes para o surgimento do cancro: promoção da angiogénese, instabilidade genómica e mutação, capacidade de invasão e geração de metástase, inibição dos genes supressores de tumor, inflamação como agente promotor tumoral, evasão do sistema imunológico, reprogramação metabólica, resistência à apoptose, sustentação da sinalização proliferativa e imortalidade replicativa. Adaptado de [2]

### **1.1.1. Sustentação da sinalização proliferativa**

Uma característica das células cancerígenas é a capacidade de proliferarem continuamente. Nos tecidos normais, a produção e liberação de sinais promotores de crescimento que instruem a progressão através do ciclo de crescimento e divisão celular, são cuidadosamente controlados, garantindo assim uma homeostase do número de células e a manutenção das funções normais dos tecidos. As células cancerígenas conseguem a desregulação desses sinais. Os sinais de ativação são transmitidos em grande parte por fatores de crescimento que se ligam aos recetores da superfície celular, tipicamente contendo domínios de tirosina quinase intracelular. Estes procedem à emissão de sinais através de vias de sinalização intracelular ramificadas que regulam a progressão através do ciclo celular, bem como o crescimento celular [2]. Estes recetores com função de tirosina quinase (RTKs) estão comumente desregulados nas células cancerígenas, incluindo o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) [4-5]. As células cancerígenas podem adquirir a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa de diversas maneiras: podem produzir ligandos de fatores de crescimento, aos quais podem responder pela expressão dos respetivos recetores, resultando num estímulo proliferativo autócrino; ou podem também enviar sinais para estimular células normais dentro do estroma [6-7]. A sinalização do recetor pode ser desregulada, aumentando os níveis de recetores na superfície da célula cancerígena, tornando-a hiper-responsiva aos fatores de crescimento. Alterações estruturais nos recetores também podem promover a ativação independente de ligandos. Esta independência dos fatores de crescimento também pode derivar da ativação constitutiva de componentes das vias de sinalização que operam a jusante desses recetores, evitando a necessidade de estimular essas vias pela ativação do recetor [2].

### **1.1.2. Inibição dos genes supressores de tumores**

Além das células cancerígenas induzirem e sustentarem estímulos ao crescimento celular, também contornam programas que regulam negativamente a proliferação celular, programas esses que dependem da atuação de genes supressores de tumores (GST). Os GST têm um papel proeminente na inibição das cascatas de sinalização de crescimento; no entanto, a sua perda de função é frequente em células tumorais [8]. Sendo a evasão aos sinais anti-crescimento, um passo essencial para que as células cancerígenas continuem a proliferar, estas precisam de inibir de alguma maneira os GST [9]. As proteínas de retinoblastoma (pRb) e a P53 são codificadas por dois desses GST, e regulam a proliferação celular e a morte celular por apoptose desencadeando a proliferação das células ou, alternativamente, a ativação de programas de senescência e

apoptose. A pRb inativa o E2F, um importante fator de transcrição para a progressão do ciclo celular e replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA). A sua inativação depende do aumento intracelular de ciclina D que resulta da integração de sinais de diversas fontes extracelulares e intracelulares que determinam se uma célula se mantém quiescente ou prossegue no seu ciclo de crescimento e divisão. Células cancerígenas com mutações que inativam a função da pRB podem entrar num ciclo de proliferação contínuo. Enquanto a pRB traduz sinais inibidores de crescimento que se originam amplamente fora da célula, a P53 recebe informações de sensores de *stress* que funcionam em sistemas intracelulares. Se ocorre um dano no genoma ou se os níveis de nucleótidos, sinais de promotores de crescimento, glicose ou oxigenação se encontram abaixo do normal, a P53 pode interromper a progressão do ciclo celular até que essas condições sejam normalizadas. Como alternativa, na presença de danos mais graves ou irreparáveis no genoma, a P53 pode desencadear a apoptose [2]. Outros supressores de crescimento proeminentes são os inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDKI), que são ativados pela p53 e inibem a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S [8]. Foram observadas mutações nos GST em células cancerígenas, sendo os mais frequentes: p53, a fosfatase homóloga à tensina (PTEN), pRb, gene do cancro da mama (BRCA), Von Hippel-Lindau (VHL), inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) e tumor de Wilms (WT1) [9].

### **1.1.3. Resistência à Apoptose**

A morte celular por apoptose não só pode ocorrer durante os processos normais de desenvolvimento e manutenção das células, como também em resposta aos danos no DNA [10]. A apoptose é um processo iniciado por duas vias principais: via intrínseca e via extrínseca. A via intrínseca está intimamente relacionada com a permeabilização das mitocôndrias e é regulada pela homeostase de proteínas pró e anti-apoptóticas [11]. Por outro lado, a via extrínseca envolve recetores de morte que pertencem à superfamília do recetor do fator de necrose tumoral (TNFR) e que compartilham um 'domínio de morte' citoplasmático, crucial para a transmissão do sinal para as vias de sinalização intracelular [10]. A via extrínseca é iniciada pela ativação de recetores de morte na membrana celular por ligandos específicos [12]. Cada via culmina, respetivamente, na ativação das caspases 9 e 8 (normalmente latentes) levando a uma cascata de proteólise envolvendo caspases efetoras que são responsáveis pela fase de execução da apoptose, na qual a célula é progressivamente degradada. As células cancerígenas têm elevada resistência à apoptose pois desenvolvem diversas estratégias para limitar ou contornar a apoptose. A mais comum é a perda da função da P53, observada em mais de metade dos tumores de diversos órgãos, que impede a deteção de sinais de dano nos circuitos indutores de

apoptose. Alternativamente, os tumores podem aumentar a expressão de reguladores anti-apoptóticos ou de sinais de sobrevivência, e também diminuir a regulação de fatores pró-apoptóticos. A multiplicidade de mecanismos das células cancerígenas para resistir à apoptose contribui para a evolução de um tumor para o estado maligno [2].

#### **1.1.4. Ativação da imortalidade replicativa**

Sabe-se que as células cancerígenas requerem um potencial replicativo ilimitado para gerar tumores. O mesmo não acontece nos tecidos normais, uma vez que, são capazes de limitar os ciclos de crescimento e divisão celular. Essa limitação é associada a duas barreiras à proliferação: a senescência, uma entrada tipicamente irreversível para um estado não proliferativo, mas viável; e a crise, que envolve a morte celular. Em raras ocasiões, as células emergem de uma população em crise e exibem um potencial replicativo ilimitado. A essa transição denominou-se imortalização [2]. Sabe-se que os telômeros mantêm a integridade do DNA, protegendo assim as extremidades dos cromossomos, mas que estes diminuem progressivamente a cada divisão celular. O comprimento dos telômeros é mantido pela telomerase. A transcriptase reversa da telomerase (hTERT) é a subunidade catalítica e a sua expressão é a etapa limitante na atividade desta enzima [13]. Ao encurtar o telômero, as células normais entrariam numa fase de senescência replicativa, onde não poderiam mais proliferar, ou entrariam em crise. No entanto, através de várias estratégias, as células cancerígenas escapam desse fenômeno, sendo assim capazes de proliferar continuamente. [8]. A maioria dos tumores humanos reativam a expressão da hTERT, permitindo obter imortalidade replicativa, evitando a morte e senescência celular associadas ao encurtamento dos telômeros [13]. A eventual imortalização das células cancerígenas foi atribuída à capacidade de manter o DNA telomérico num certo comprimento que evite a senescência ou apoptose, alcançada pela regulação positiva da expressão da telomerase ou, por uma recombinação alternativa baseada num mecanismo de manutenção de telômeros. Assim, o encurtamento dos telômeros é visto como um processo crucial que determina o potencial replicativo limitado das células normais e, portanto, que é superado pelas células cancerígenas [2].

#### **1.1.5. Promoção da angiogénese**

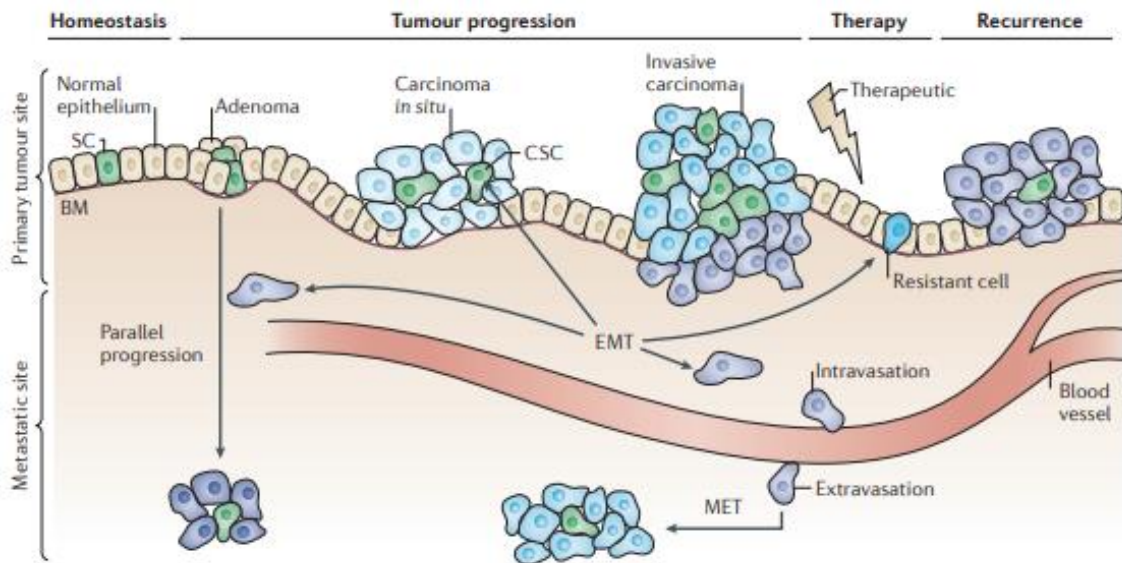
A angiogénese é um processo normal vital no desenvolvimento do embrião, cicatrização de feridas, formação de tecidos, mas também é fundamental na transição de um tumor do estado benigno para um estado maligno [14]. Baseia-se na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes – neovascularização – promovendo o crescimento do tumor e a metastização. É um processo dinâmico e complexo que envolve

múltiplos mecanismos e é regulado por diversas moléculas [15]. Durante a angiogénese, as células cancerígenas secretam vários fatores pró-angiogénicos como: o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2); que estimulam o crescimento das células endoteliais e, conseqüentemente, a produção de enzimas digestivas [8]. Fatores bem conhecidos de indutores e inibidores de angiogénese são respetivamente, o fator VEGF-A e a trombospondina-1 (TSP-1). O gene VEGF-A codifica ligandos envolvidos no crescimento de novos vasos durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal e na sobrevivência homeostática de células endoteliais, bem como em situações fisiológicas e patológicas num indivíduo adulto. Além disso, membros da família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF), têm sido implicados na sustentação da angiogénese tumoral quando a sua expressão é aumentada. Por outro lado, a TSP-1 evoca sinais supressores que podem neutralizar estímulos pró-angiogénicos [2]. Os vasos sanguíneos produzidos em tumores, por uma angiogénese crónica e um desequilíbrio de sinais pró-angiogénicos, são normalmente aberrantes. A neovasculatura de um tumor é marcada por um crescimento capilar precoce, uma ramificação complexa e excessiva, vasos distorcidos e aumentados, micro-hemorragias, fluxo sanguíneo irregular e níveis anormais de proliferação e apoptose de células endoteliais [16]. Tal como os tecidos normais, os tumores também têm a necessidade de nutrientes e oxigénio para a sua sobrevivência, bem como para eliminar resíduos metabólicos e dióxido de carbono. A neovasculatura associada ao tumor supre essas necessidades. Num indivíduo adulto, durante a progressão de um tumor, um 'interruptor angiogénico' é ativado, promovendo a formação de novos vasos que sustentam crescimentos neoplásicos em expansão [2]. Caso não exista um suprimento suficiente de oxigénio através dos vasos, as células cancerígenas sofrem uma condição de hipóxia. Nesta situação, o fator induzido por hipóxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) é ativado e induz a expressão de vários genes que promovem atividades mitogénicas e migratórias das células endoteliais, mediando a adaptação e sobrevivência à situação de hipóxia [17][18] através da indução da neovascularização dos tumores.

#### **1.1.6. Invasão e metastização**

O processo de metastização é responsável por mais de 90% de mortalidade de pacientes com tumores sólidos e engloba uma sucessão de alterações biológicas celulares. Inicia-se com a invasão local, onde as células cancerígenas entram nos vasos sanguíneos e linfáticos próximos, seguido pelo extravasamento dessas células noutros tecidos, onde se formam micrometástases e, posteriormente se desenvolvem tumores macroscópicos (colonização) [2]. As células cancerígenas iniciam este processo produzindo diversas

proteínas que desempenham papéis importantes na adesão célula-célula, adesão matriz-célula, migração celular e transição epitelial-mesenquimal (EMT) [8]. A EMT é um programa celular crucial que permite que as células epiteliais polarizadas transitem para um fenótipo mesenquimal com uma mobilidade celular aumentada (Figura 2) [19]. A perda da polaridade apical-basal, a perda dos contatos célula-célula epiteliais, incluindo junções apertadas, junções aderentes e desmossomas; e a arquitetura reorganizada do citoesqueleto de actina, conferem às células um fenótipo mesenquimal que permite maior mobilidade. Além disso, as células com características EMT são frequentemente capazes de degradar e invadir a matriz extracelular basal, expressando metaloproteinases de matriz (MMPs) [8]. A expressão ou função de genes epiteliais como a E-caderina, citoqueratinas e a *zonula occludens-1* (ZO-1) são perdidas durante a transição [20], enquanto a expressão de genes que definem o fenótipo mesenquimal, como vimentina, fibronectina, N-caderina e as integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 3$ , aumenta. A fim de orquestrar este programa complexo, um grupo de fatores de transcrição juntamente com reguladores epigenéticos, pós-transcricionais e pós-traducionais são ativados em resposta a sinais pleiotrópicos [19]. Visto que a EMT aumenta a mobilidade celular, foi associada à disseminação de células tumorais. Este tipo de células sofrem uma EMT incompleta durante a metástase, onde estudos recentes confirmaram a existência desses estados parciais de EMT durante a progressão do tumor *in vivo* [21]. Na verdade, os carcinomas perdem frequentemente marcadores epiteliais ou expressam marcadores EMT na frente invasiva e em células tumorais circulantes, que representam as primeiras etapas da cascata metastática (invasão e intravasamento, respectivamente) [22]. No tumor primário, as células cancerígenas na frente invasiva são submetidas a EMT sob a influência de fatores de crescimento indutores de EMT produzidos por células tumorais ou células do estroma. Com base em diferentes graus de transição para o estado semelhante ao mesenquimal, as células tumorais invadem a membrana basal e os tecidos circundantes através da migração coletiva ou da invasão celular individual. Ao atingir órgãos distantes, as células tumorais são submetidas ao processo inverso, transição mesenquimal-epitelial (TEM), ou seja, a conversão de células mesenquimais não polarizadas e móveis em células epiteliais polarizadas, que está tipicamente associada a níveis aumentados de caderina-E e baixa invasão de células cancerígenas e metástases [23]. Além de promover a metástase, a EMT induz também uma variedade de características malignas em células tumorais, como quimiorresistência, evasão imune, metabolismo alterado e bloqueio da senescência [19].



**Figure 2** - A disseminação e subsequente migração das células tumorais após a rutura da membrana basal, requer que as células adquiram características mesenquimatosas (transição epitelial-mesenquimal-EMT) até conseguirem entrar na corrente sanguínea e extravasarem para os órgãos onde vão formar micrometástases. Após deixarem os vasos sanguíneos as células sofrem então o processo inverso e voltam ao fenótipo epitelial (transição mesenquimal para epitelial-MET). Adaptado de [23]

### 1.1.7. Instabilidade genómica e mutação

Diariamente, cada célula acumula cerca 105 lesões no DNA que, se não forem reparadas, podem interferir em processos celulares como a transcrição e a replicação, promovendo instabilidade genómica e, eventualmente, a carcinogénese. Estas lesões advêm da instabilidade química espontânea do DNA (como a hidrólise de bases) ou do ataque por espécies reativas de oxigénio (ROS) derivadas da respiração oxidativa. Para além disso, as lesões são mais graves quando se verifica a exposição a agentes genotóxicos como a luz ultravioleta, radiação ionizante e agentes químicos. Como o DNA não pode ser substituído, a reparação de danos é crucial para proteger as células contra a erosão genética e o stress de transcrição e replicação. Assim, as células possuem mecanismos de reparação para lidar com os diferentes tipos de lesões que poderão ocorrer no DNA [24]. No entanto, podem ocorrer defeitos nos genes de reparação que estão envolvidos em detetar os erros no DNA, ativar a maquinaria de reparação, reparar diretamente o DNA e inativar ou intercalar moléculas mutagénicas. De uma perspetiva genética, esses genes funcionam de uma forma semelhante aos GST, na medida em que as suas funções podem ser perdidas durante a progressão tumoral, perdas essas alcançadas por mutações inativadoras ou por repressão epigenética. Avanços na análise de genomas de células cancerígenas, demonstraram que durante a progressão tumoral se verifica a ocorrência de mutações que alteram a função e a ocorrência de instabilidade genómica contínua [2]. É importante referir que a recorrência de mutações em locais específicos do genoma

indica que esses locais provavelmente abrigam genes cuja alteração favorece a progressão neoplásica [25]. Embora as especificidades da alteração do genoma variem entre os diferentes tipos de tumor, o número de erros de manutenção e reparação, juntamente com a desestabilização do número de cópias dos genes e da sequência nucleotídica, a instabilidade do genoma é inerente à maioria das células cancerígenas humanas, levando à conclusão de que os defeitos na manutenção e na reparação do genoma são relevantes para a progressão tumoral.

### **1.1.8. Inflamação como agente promotor tumoral**

A inflamação é reconhecida como um fator indutor do desenvolvimento e progressão tumoral. Muitos investigadores, relacionam a inflamação à reação imunológica encontrada no microambiente do tumor que, frequentemente, contribui para o seu desenvolvimento [26]. A inflamação pode contribuir para vários fatores: fornece moléculas bioativas ao microambiente tumoral, incluindo fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a apoptose, fatores pró-angiogênicos, enzimas modificadoras da matriz extracelular que facilitam a angiogênese, invasão e metástases; e sinais que levam à ativação da EMT [2]. Além disso, as células inflamatórias podem libertar substâncias químicas, como ROS, que são altamente mutagênicas para as células cancerígenas, acelerando a sua evolução e malignidade [27]. A inflamação crónica propensa ao cancro é comumente descrita como um ambiente imune do tipo 2, contendo múltiplas células imunes pró-carcinogênicas e fatores, incluindo células T helper 2, células T reguladoras, macrófagos M2, mastócitos, eosinófilos e derivados de mielóides de células supressoras, interleucina-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento transformador- $\beta$ , quimiocinas e outros fatores de crescimento. Embora o direcionamento desses fatores promotores de tumor na inflamação crónica possa reduzir a taxa de desenvolvimento do cancro, a reversão completa da promoção do tumor, bloqueando todas essas vias efetoras, é impraticável [27]. Como tal, a inflamação pode ser considerada uma característica fundamental para a progressão tumoral.

### **1.1.9. Evasão ao sistema imunitário**

A imunidade de um indivíduo propõe que as células e os tecidos sejam constantemente monitorizados, e que essa vigilância seja responsável por reconhecer e eliminar a grande maioria de células tumorais precoces. Pontos de verificação imunológicos, como a proteína associada ao linfócito-T Citotóxico (CTLA-4), a proteína programada 1 da morte celular (PD-1) e o seu ligando (PD-L1), representam um obstáculo significativo às respostas imunes anti-tumorais eficazes. As vias co-inibidoras de linfócitos T

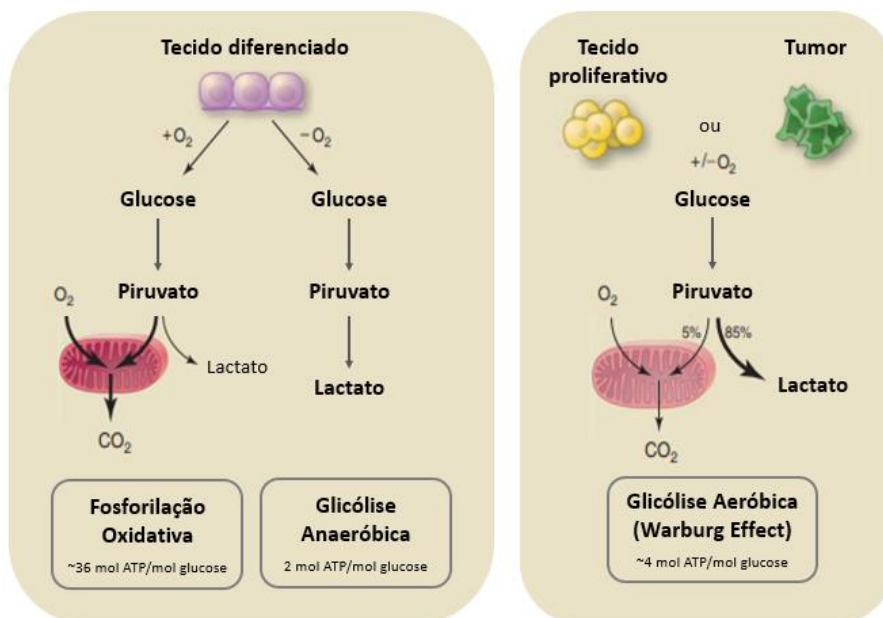
influenciam a intensidade, a inflamação e a duração da imunidade antitumoral [28]. No entanto, os tumores e seus microambientes imunossupressores exploram-nos para evitar a destruição imune. Embora a maioria dos tumores malignos possam ser reconhecidos pelas células T *natural killer* (NK) e linfócitos T, as células cancerígenas evoluem para adquirir instabilidades genéticas e outras características associadas que podem permitir a evasão imunológica e, assim, um crescimento persistente [2]. Foi demonstrado que a imunidade deteta "neoantígenos" de células tumorais *in vitro*, no entanto, o reconhecimento de neoantígenos por si só não elimina os tumores *in vivo*, dado o microambiente complexo inerente, a natureza heterogênea e a rigidez dos tumores [29][30]. De fato, os neoantígenos raramente são reconhecidos e provocam espontaneamente respostas antitumorais das células T [31]. Uma matriz de células imunes normais como células T, células B e células NK, associa-se a células cancerígenas e à matriz extracelular para formar o microambiente tumoral que se trata de uma rede imunossupressora dinâmica e um obstáculo à intervenção imunoterapêutica [30]. No microambiente tumoral, adipócitos, células T reguladoras e fibroblastos, juntamente com uma rede de citocinas e fatores de crescimento, promovem a proliferação celular [28]. Na verdade, as células cancerígenas altamente imunogênicas podem evitar a destruição imune, através de estratégias como: a modificação de células imunes reguladoras, a apresentação defeituosa do antígeno nas células tumorais, imunossupressores, tolerância e desvio imunológico, e indução da apoptose de células imunes [32]. Por exemplo, as células cancerígenas podem paralisar a infiltração de linfócitos T citotóxicos CD8+ e células NK, secretando TGF- $\beta$  ou outros fatores imunossupressores. Outros mecanismos operam através do recrutamento de células inflamatórias ativamente imunossupressoras, incluindo linfócitos T-reguladores (Tregs) e células supressoras derivadas de mielóides que podem suprimir as ações dos linfócitos citotóxicos [2]. Com estas considerações de imunidade antitumoral como uma barreira significativa à formação e progressão tumoral em humanos, a evasão do sistema imunitário apresenta-se como outra característica do cancro.

#### **1.1.10. Reprogramação do metabolismo energético**

Todas as células dependem da absorção de nutrientes, que são direcionados para várias vias metabólicas para produzir energia, de forma a manter a homeostase celular. O metabolismo celular num tecido normal é diferente comparativamente a um tumor. Nos organismos multicelulares, a maioria das células são expostas a um suprimento constante de nutrientes, sendo necessário a presença de sistemas de controlo que evitem a proliferação celular descontrolada quando a disponibilidade de nutrientes excede os níveis necessários. Essa proliferação descontrolada é evitada uma vez que as células só

consomem nutrientes do ambiente quando são estimuladas a fazê-lo por fatores de crescimento [33]. O mesmo não acontece nas células cancerígenas. Como resultado de mutações genéticas que alteram as vias de sinalização, as células cancerígenas não dependem de fatores de crescimento para promover a captação e o metabolismo de nutrientes, que sustentam o crescimento celular, promovendo assim a tumorigênese. Além disso, vários estudos demonstraram que as vias de sinalização alteradas nas células cancerígenas têm um papel crucial na alteração do metabolismo celular, para responder às exigências de energia e promover a proliferação celular potenciando a biossíntese de adenosina trifosfato (ATP) e conservando o estado celular redox [33]. O metabolismo energético reprogramado surge como uma marca registrada das células cancerígenas. Ao contrário das células normais, que metabolizam a glicose em piruvato que entra no ciclo do ácido tricarboxílico para gerar ATP, dependendo principalmente da fosforilação oxidativa mitocondrial [34]; as células cancerígenas têm a capacidade de fermentar glicose em lactato para produzir energia, mesmo na presença de oxigênio suficiente, um fenômeno chamado glicólise aeróbica, também conhecido como *Efeito de Warburg* [35]. Warburg observou que, mesmo na presença de oxigênio, as células cancerígenas restringiam o seu metabolismo energético principalmente à glicólise, com consequente produção abundante de lactato [36]. Estes processos encontram-se ilustrados na Figura 3. Contrariamente, as células normais em condições aeróbicas, utilizam o piruvato originado da glicose via glicólise para produzir ATP através da fosforilação oxidativa (FO), um processo que é muito mais eficiente em termos energéticos. Um tumor maligno consegue adaptar-se a um ambiente com privação de nutrientes, da seguinte forma: primeiro desenvolve um novo mecanismo ou adota uma via metabólica alternativa para aumentar a captação de nutrientes ou oxigênio, como por exemplo o aumento da angiogênese; em segundo lugar, aumenta a expressão de transportadores de glicose, geralmente, GLUT-1 e GLUT-4 para a captação eficiente de glicose [37], garantindo assim a sobrevivência do tumor. Essa reprogramação do metabolismo energético não é, aparentemente, muito intuitiva, uma vez que as células cancerígenas apresentam uma menor eficiência na produção de ATP através do processo glicólise relativamente ao processo de fosforilação oxidativa. No entanto, optam por fazê-lo pela regulação positiva dos transportadores de glicose, principalmente o GLUT1, o que aumenta substancialmente a importação de glicose para o citoplasma [2]. Suspeita-se que seja a hipóxia – privação de oxigênio – a base da reprogramação metabólica das células tumorais. Quando ocorre hipóxia, o fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  é ativado e induz a expressão dos genes envolvidos na glicólise, incluindo o GLUT-1, o GLUT-3, a hexocinase 2, a piruvato quinase 2, a lactato desidrogenase (LDH) e a piruvato desidrogenase quinase 1 [38]. As vantagens do efeito Warburg estendem-se além da geração de grandes quantidades de ATP. Uma dessas

vantagens inclui alterações no metabolismo do cancro que auxiliam na síntese de macromoléculas essenciais para a proliferação de células tumorais, incluindo nucleótidos, ácidos gordos e proteínas. Duas das atividades biossintéticas essenciais para a proliferação de células tumorais são a produção de ácidos gordos para a síntese lipídica e ribose-5-fosfato para a biossíntese de nucleótidos. O efeito Warburg é, portanto, crítico, pois permite que células normais e células tumorais em proliferação, desviem o carbono da glicose para as vias biossintéticas [34]. A acidose láctica é outro microambiente comum em tumores sólidos. Estudos recentes demonstraram que o ácido láctico pode representar uma fonte de altos níveis de ATP e de resistência à apoptose [39]. Ou seja, o ácido láctico induz uma readaptação metabólica, permitindo que as células tumorais se adaptem e resistam aos vários microambientes. A produção de lactato tem por objetivo a regeneração do NAD<sup>+</sup> para que possa continuar a ocorrer glicólise, uma vez que a passagem de piruvato a lactato é assegurada por este cofator, por ação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Ao fazer esta conversão, a LDH tem um papel crítico na produção de energia levando ao aumento da proliferação das células [40]. Antes considerado um produto residual do metabolismo anaeróbico, sabe-se agora que o lactato se forma continuamente sob condições aeróbicas. Para além disso, a transferência entre células produtoras e consumidoras cumpre pelo menos três finalidades para o lactato: (1) uma importante fonte de energia, (2) o principal precursor gliconeogénico e (3) uma molécula de sinalização [41].



**Figura 3** - Esquema das diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (efeito de Warburg). Na presença de oxigénio, os tecidos diferenciados metabolizam a glicose em piruvato pela via da glicólise e depois oxidam completamente a maioria dos piruvatos a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na mitocôndria – Fosforilação oxidativa (FO). Quando o oxigénio é escasso, as células podem redirecionar o piruvato gerado pela glicólise para longe da FO, gerando lactato – Glicólise anaeróbica. Tecidos proliferativos ou tumores utilizam preferencialmente glicólise em vez da FO para produzir energia mesmo na presença de oxigénio suficiente, um fenómeno chamado glicólise aeróbica/Efeito Warburg. Adaptado de [33].

## 1.2. Tumores do sistema nervoso central

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) apresentam as características comuns aos tumores de outros sistemas. Alterações na transcrição de genes, na modulação epigenética e fatores ambientais podem fazer com que estas células mudem o seu perfil de expressão e apresentem uma morfologia e bioquímica aberrantes. Estes tumores são classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com base no grau de invasividade, podendo ser de grau I, com pouco potencial proliferativo e removível através de cirurgia, até ao grau IV, com um comportamento maligno, ativo mitoticamente com sinais necróticos e associado a uma evolução rápida da doença, e com um péssimo prognóstico. Na Tabela 1, são evidenciados alguns tipos de tumores do SNC e respetiva classificação pela OMS [42]. O glioma é o tipo mais comum de tumor cerebral em adultos. Originário das células da glia, os gliomas são tumores que crescem invasivamente, com rápida taxa de difusão e alta taxa de recorrência [43], sendo a quimioterapia ainda um dos tratamentos mais importantes. No entanto, a eficácia do tratamento é limitada pelo acesso restrito de medicamentos ao SNC causado pela barreira hematoencefálica [44]. Devido à capacidade invasiva e metastática das células tumorais, há ainda um baixo efeito terapêutico e uma possibilidade de reaparecimento do tumor [43]. Essa invasividade deve-se à EMT, onde as células epiteliais perdem as células polares e a conexão entre elas, sendo a membrana basal enfraquecida. A matriz extracelular é modificada, transformando as células epiteliais em células intersticiais com maior capacidade de migração, invasão e anti-apoptose [43]. No entanto, o que acontece durante a progressão do glioma não é uma EMT completa, mas sim um processo semelhante, denominado transformação *epitelial-like* (EMT-like), no qual o fenótipo epitelial é cada vez menos evidente em relação ao fenótipo intersticial [43]. As células tumorais não apresentam junções firmes entre elas após a EMT, daí serem altamente invasivas. As células nas quais ocorre a EMT são caracterizadas por uma diminuição na caderina-E, uma regulação positiva da vimentina (suporte e ancoragem) e um aumento nos níveis de N-caderina [43]. Os gliomas podem ser classificados, com base na morfologia e histologia, em astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas, ependimomas e glioblastomas [45]. De facto, tem-se procurado entender as peculiaridades relativas a cada tumor para que se possa traçar as melhores estratégias para o tratar. Neste trabalho será abordado um tipo de glioma, um tumor que se desenvolve no SNC, denominado Glioblastoma multiforme (GBM).

Tabela 1. Tumores do SNC: as suas respectivas características celulares e a classificação de invasividade de acordo com a OMS, a qual varia de forma crescente de I a IV. Adaptado de [42]

Designação do tumor	Células de origem	Classificação
Schwannoma	Células de Schwann	I
Astrocitoma	Astrócitos	I a III
Meningioma	Células da meninge	I a III
Ependimoma	Ependimócitos	I a III
Oligodendrioma	Oligodendrócitos	II a III
Meduloblastoma	Células granulares do cerebelo	IV
Glioblastoma multiforme	Astrocitomas de grau avançado	IV

### 1.3. Glioblastoma

O GBM é o tumor cerebral maligno agressivo mais comum, compreendendo 16% de todas as neoplasias primárias do cérebro e do SNC [46]. Este tipo de tumor maligno surge nas células da glia, mais concretamente nos astrócitos do SNC [47]. O GBM, classificado pela OMS como um glioma grau IV, possui maior incidência em adultos na faixa etária entre os 45 e 75 anos e em indivíduos do sexo masculino, e compreende 50% do total de casos de gliomas [47]. Ocorre na região subcortical do cérebro, podendo localizar-se em diferentes regiões, como nos lobos temporais, parietais e frontais. O GBM exhibe o fenótipo mais maligno e agressivo de todos os gliomas, caracterizado por altos níveis de heterogeneidade celular, com células tumorais diferenciadas e não diferenciadas e áreas de tecido necrosado, bem como resistência à apoptose, neoangiogénese e rápida proliferação [48]. Embora os GBMs ocorram quase exclusivamente no cérebro, a infiltração no tecido cerebral normal circundante e a possível extensão na parede ventricular ou meninges, podem culminar na libertação de células cancerígenas no líquido espinhal cerebral e, conseqüentemente, disseminação para a medula espinhal [46]. Apesar de todos os esforços, devido à malignidade do tumor, a esperança média de vida dos doentes com GBM é de, aproximadamente, 15 a 18 meses [49][50] após o diagnóstico e, mesmo em condições favoráveis, a maioria dos pacientes sucumbe à doença em 2 anos [51]. Como resultado das suas características altamente proliferativas e invasivas, o GBM pode afetar diversas áreas do cérebro e dependendo da área afetada e do tamanho do tumor, os pacientes manifestarão sintomas diversos, sendo os mais comuns: náusea, dor de cabeça, convulsões, alterações de humor e personalidade e défices neurológicos [52][46]. Estes sintomas podem ser causados pelo próprio tumor ou podem ocorrer parcialmente como efeitos colaterais das terapias [53][54]. Com base na crescente

compreensão da heterogeneidade molecular no GBM, o Atlas do Genoma do Cancro dividiu esse tumor em subclasses moleculares denominadas: clássico, mesenquimal, pró-neural e neural [52][47]. Atualmente, o GBM está dividido em dois tipos principais, primário e secundário, nos quais o primeiro compreende a maioria dos casos de GBM em todo o mundo, enquanto o segundo é mais raro [47]. Os GBMs primários não possuem um precursor conhecido e evoluem rapidamente; os secundários, podem desenvolver-se lentamente (5 a 10 anos) a partir de um astrocitoma de baixo grau (grau II ou III). O GBM primário representa mais de 90% desses tumores. Desenvolvem-se com maior frequência em pacientes do sexo masculino com mais de 60 anos e são caracterizados por uma breve história clínica (cerca de 1 ano após o diagnóstico). GBM secundários são raros (10%) e ocorrem em pacientes mais jovens (idade média de 45 anos). São caracterizados por uma história clínica mais longa e têm um prognóstico melhor que o GBM primário [42]. Estes dois subtipos de GBM apresentam alterações genéticas diferentes e, conseqüentemente, vias moleculares alteradas distintas, dando origem a uma proliferação descontrolada e a uma maior sobrevivência celular [46]. De facto, o GBM primário é essencialmente caracterizado por uma amplificação e mutação do EGFR, uma diminuição de p16INK4a (inibidor de quinase dependente de ciclina p16 4a) e um PTEN mutado. Pelo contrário, o GBM secundário é caracterizado principalmente por mutações no genes que codificam a p53 e a isocitrato desidrogenase (IDH1) e uma expressão aumentada do PDGFR-A [46][52][42]. Ambas as mutações no PDGFR-A e no EGFR, resultam numa atividade aumentada de RTKs, envolvidos em inúmeras vias de sinalização, como a RAS, PI3K e MAPK, cruciais no desenvolvimento e proliferação de tumores [52]. Na imagem de diagnóstico inicial, os GBMs apresentam uma massa de forma irregular e um centro de necrose, uma característica marcante desta neoplasia. Os esforços realizados para identificar associações específicas desta doença com a exposição ambiental e ocupacional têm sido amplamente inconclusivos. Porém, a radiação ionizante é um dos fatores de risco conhecidos que definitivamente mostram um risco aumentado no desenvolvimento de gliomas [46].

### **1.3.1. Estratégias terapêuticas**

Embora os regimes terapêuticos atuais tenham melhorado nos últimos anos, a sobrevida global dos pacientes com GBM não aumentou significativamente. A terapia padrão atual para o GBM inclui ressecção cirúrgica, seguida de radiação simultânea com temozolomida (TMZ) e, em seguida, quimioterapia adjuvante com TMZ [50]. A ressecção cirúrgica extensa e completa deste tipo de tumor é difícil, uma vez que os GBMs são invasivos e geralmente encontram-se em áreas inacessíveis do cérebro [46]. Devido ao alto grau de invasividade, a ressecção da massa primária do tumor não é suficiente, uma vez que as

células tumorais infiltradas permanecem nos tecidos circundantes devido à disrupção da barreira hematoencefálica (BHE) [49] levando, posteriormente, à progressão ou recorrência da doença [46]. A TMZ é um pró-fármaco que funciona como agente alquilante, ou seja, tem a capacidade de formar compostos que se ligam ao DNA por ligações covalentes através de um grupo alquil. Após administração oral, a TMZ é absorvida no intestino delgado, tendo a capacidade de atravessar a BHE [50] devido à sua lipofilicidade e pequeno tamanho (194 Da). Em seguida, uma vez em contacto com o pH fisiológico do sangue, sofre hidrólise espontânea para se tornar num metabolito ativo, o metildiazónio (MTIC). O MTIC é o principal responsável pela metilação dos resíduos de guanina nas posições N7 e O6, bem como resíduos de adenina na posição N3 [55], representando assim a atividade citotóxica da TMZ [56]. Embora a posição O6 da guanina seja um alvo menos frequente do MTIC (apenas 8%), o aducto de O-6-metilguanina resultante é o mais genotóxico, durante a replicação do DNA. Quando as enzimas de reparação de incompatibilidade – *mismatch repair* – tentam clivar o aducto, a geração de quebras na cadeia de DNA induz a interrupção do ciclo celular, a precipitação de apoptose e autofagia que resulta na morte de células tumorais [57]. Apesar da TMZ ter induzido uma boa taxa de resposta, o aumento da esperança média de vida dos pacientes que recebem essa combinação, em comparação à radioterapia, continua a ser muito modesto. Um dos motivos será porque o local de ação da TMZ requer a sua entrada no SNC através da BHE e, com administração oral, embora 100% da dose entre no fluxo sanguíneo, a taxa de penetração da TMZ do sangue para o líquido cefalorraquidiano é de apenas 20 a 30% [58]. Para além disso, é importante mencionar que, mesmo que os protocolos terapêuticos disponíveis possam ser bem-sucedidos, este tumor é altamente resistente a medicamentos e a recorrência ocorre em quase todos os casos [58]. Por esse motivo, devido às opções terapêuticas limitadas para pacientes com GBM, a quimiorresistência da TMZ tornou-se uma área ativa de pesquisa [59], visto que as células tumorais podem adquirir resistência contra agentes citotóxicos de diversas formas. Portanto, é necessário descobrir alvos mais específicos, de maneira a melhorar a eficácia do tratamento e a contornar a quimiorresistência.

### **1.3.2. Mecanismos de resistência aos fármacos no glioblastoma**

Os avanços no tratamento deste tipo de tumor no cérebro são limitados devido a vários mecanismos de resistência. Tais mecanismos envolvem a entrada limitada de medicamentos pela BHE e por ações do SNC para combater os medicamentos direcionados ao tumor. Além disso, a grande heterogeneidade no GBM contribui para uma resistência terapêutica significativa, impedindo o controlo adequado de toda a massa tumoral por um único medicamento e facilitando os mecanismos de escape dos agentes-alvo. As

características das células estaminais do GBM promovem resistência à quimioterapia, radiação e imunoterapia através da regulação de transportadores de efluxo, promoção da proliferação de células estaminais de GBM em zonas neurogênicas e supressão imune, respetivamente. As cascatas metabólicas no GBM impedem tratamentos efetivos através da otimização do uso de glicose, do uso de precursores de nutrientes alternativos para produção de energia e da indução de hipóxia para melhorar o crescimento do tumor. Uma variedade de técnicas moleculares está a ser desenvolvida para atingir o tumor, com a esperança de que essa estratégia personalizada ultrapasse a resistência terapêutica [60]. Embora cada mecanismo de resistência represente uma série de desafios ao tratamento eficaz do GBM, à medida que investigadores na área reconhecem e solucionam essas dificuldades, os tratamentos futuros podem ter mais eficácia nestes pacientes. A BHE constitui um obstáculo na administração de agentes terapêuticos para o tratamento do GBM. Esta barreira funciona como uma interface protetora entre o compartimento do SNC e a circulação sistémica para restringir a entrada de toxinas, células inflamatórias e macromoléculas no parênquima cerebral. O principal componente da BHE é a camada endotelial que reveste os vasos sanguíneos e cria uma barreira formada por junções apertadas. Células de suporte da BHE incluem pericitos e astrócitos, que regulam a fidelidade dessas junções estreitas e controlam mecanismos enzimáticos, de transporte e de efluxo críticos [61]. O GBM causa disfunção da BHE através de uma variedade de mecanismos: as proteínas de junção apertadas (claudina e ocludina) são reguladas negativamente e as proteínas transportadoras são reguladas positivamente, resultando numa maior permeabilidade [60]. Para além disso, o tumor cria os seus próprios vasos promovendo o extravasamento dos mesmos. No GBM, também aumenta a atividade das bombas de efluxo, impedindo a entrada de compostos potencialmente terapêuticos no parênquima tumoral [62]. Desta forma, mecanismos paradoxais de permeabilidade aumentada juntamente com a regulação positiva dos transportadores de membrana e as bombas de efluxo permitem que substâncias promotoras de tumor entrem no leito do tumor, limitando a entrada de compostos antitumorogénicos. Sendo um tumor altamente invasivo, as células do GBM aproveitam a sua conexão íntima com o parênquima cerebral normal para resistir à terapia. Os microtubos de tumor são longas projeções que se inserem dentro da massa tumoral para conectar células tumorais a grandes distâncias através das junções estreitas. Ao criar uma rede funcional, os microtubos são capazes de diminuir a eficácia de uma variedade de tratamentos, incluindo quimioterapia, radiação e terapia direcionada [63]. Além disso, fornecem um mecanismo importante de recorrência do tumor, ao fornecer sinais críticos de crescimento para substituir células mortas, desencadeando invasão e metástases distantes. Existe um consenso de que o GBM contém populações discretas de células estaminais cancerígenas (GSCs) [64]. Estas células são

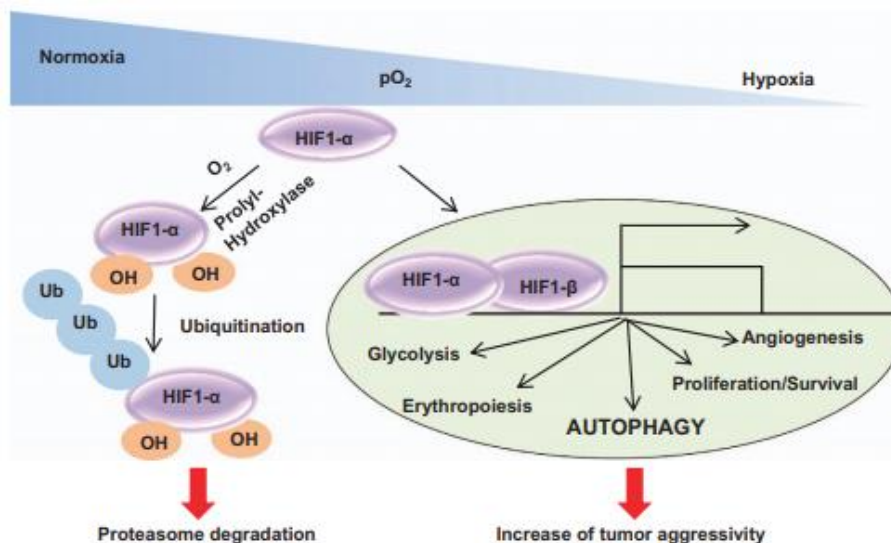
altamente resistentes à quimioterapia, terapia padrão e radiação e podem recapitular uma grande massa tumoral mesmo após a ressecção de grande parte do tumor primário. As GSCs representam uma barreira significativa à terapia no GBM e sua presença pressagia um mau prognóstico. Foram identificados vários mecanismos moleculares que medeiam a resistência terapêutica das GSCs às terapias, incluindo o ponto de verificação de danos ao DNA, o que sugere que as GSCs desenvolvam múltiplos mecanismos de resistência. [64]. Vários fatores de transcrição de GSCs aumentam a quimiorresistência através da modulação da BHE. A radiação das células de GBM *in vitro* e *in vivo* leva ao enriquecimento das GSCs através da resposta a danos no DNA [60], isto é, o tratamento com radiação promove a sobrevivência destas células e, por fim, leva à radiorresistência em tumores recorrentes.

### **1.3.3. Hipóxia e Metabolismo**

Uma das explicações possíveis para que as células tumorais prefiram a Glicólise Aeróbia à FO reside nas características do ambiente tumoral. Dentro do tumor, pode encontrar-se uma alta pressão de líquido intersticial, acidose e hipóxia. A hipóxia significa uma baixa pressão parcial de O<sub>2</sub> ( $1 < pO_2 < 10$  mm Hg), ou seja, baixa disponibilidade de O<sub>2</sub> [42]. No GBM, existe uma hipóxia de alto grau, uma vez que a pO<sub>2</sub> no interior do tumor pode cair para 1%. No entanto, as células de GBM possuem métodos para resistir à hipóxia e, conseqüentemente, tornarem-se mais agressivas. Em hipóxia, as células cancerígenas estimulam a neovascularização e secretam VEGF que promove a formação de novos vasos, permitindo o fornecimento de O<sub>2</sub> e nutrientes às células tumorais, garantindo a sua sobrevivência e levando à sua disseminação [42][65]. No entanto, essa rede vascular tumoral pode contribuir para a formação de áreas hipóxicas que favorece o aumento de células muito agressivas, resistentes à hipóxia, que desencadeiam vias de sinalização altamente conservadas para superar esse *stress* [42]. A resposta e a adaptação das células a condições de hipóxia são controladas por fatores de transcrição, sendo o mais importante nessa homeostase o HIF1, uma proteína heterodimérica (subunidade  $\alpha$  e  $\beta$ ) (Figura 4). Em condições de normoxia, o HIF1 $\alpha$  é submetido a hidroxilação, que permite o recrutamento da proteína von Hippel-Lindau (VHL), responsável pela poliubiquitinação e posterior degradação do HIF1 $\alpha$  pelo proteossoma. Por outro lado, em hipóxia, o HIF1 $\alpha$  é estabilizado e transferido para o núcleo, onde se dimeriza com o HIF1 $\beta$ . O complexo HIF1 $\alpha$ /HIF1- $\beta$  é transcricionalmente ativo e, após a ligação de vários

coativadores, pode atingir genes específicos. Quando expressos, esses genes permitem que as células de GBM lidem com a hipóxia através da autofagia, promovam a angiogênese (VEGF) e a sobrevivência celular, aumentem o metabolismo da glicose (GLUT1,3) e facilitem a invasão tumoral (MMPs) [42]. Portanto, o HIF-1 estimulará a produção de energia glicolítica e inibirá diretamente a FO, através da transativação de genes. A glicólise pode não ser tão eficiente quanto uma fonte de produção de energia, mas ocorrerá sem a necessidade de O<sub>2</sub>, que é uma característica essencial para as células tumorais terem o seu ambiente hipóxico específico [66]. Tendo em conta as alterações metabólicas que ocorrem nas células cancerígenas de GBM, com um aumento na captação e no consumo de glicose, a conversão predominante de glicose em lactato pode ser determinante para distinguir um GBM do ambiente circundante [67]. A glicólise aeróbia, caracterizada por um consumo elevado de glicose e produção de lactato, confere vantagens seletivas ao GBM, utilizando nutrientes para apoiar a rápida proliferação celular e crescimento do tumor [68]. O efeito Warburg é bem evidenciado no GBM e, por isso, nos últimos anos, houve um interesse renovado no metabolismo deste cancro. Relatórios recentes mostraram que o efeito Warburg pode ser reprogramado pelo microambiente tumoral. A acidose láctica e a privação de glicose são os microambientes adversos comuns em tumores sólidos [40]. A célula de origem de um GBM é, geralmente, astrocítica. Pode ser interessante notar que as células gliais normais têm uma capacidade glicolítica superior que os neurónios, o que pode explicar a predileção do GBM por favorecer maiores taxas de glicólise [34]. É clara a preferência das células cancerígenas pela via glicolítica para a obtenção de ATP, o que leva a uma elevada necessidade de avaliar possíveis inibidores glicolíticos como agentes anticancerígenos para testar a apoptose/necrose e a proliferação dos GBMs [40]. A nível fisiológico, a concentração de lactato é aproximadamente entre 1.8mM a 2mM, nos tecidos normais. Por outro lado, quando a glicólise está muito elevada, como no caso do GBMs, a produção de lactato aumenta, podendo atingir níveis fisiológicos de 40mM [40]. Uma hipótese de invasão mediada por ácido láctico sugere que os iões H<sub>3</sub><sup>+</sup> secretados pelas células cancerígenas, se difundem no ambiente circundante e alteram a interface tumor-estroma, permitindo maior invasividade [69]. Altos níveis de ácido láctico foram inicialmente considerados como um indicador do fluxo glicolítico, no entanto, atualmente, sabe-se que o lactato

contribui para o crescimento de tumores, para o desenvolvimento de metástases e promove a angiogénese [39][40]. Efetivamente, pacientes com altos níveis de lactato apresentam um mau prognóstico e uma baixa taxa de sobrevivência, como já foi comprovado noutros cancros na cabeça e pulmão [40]. Devido aos efeitos negativos da acidificação do organismo, torna-se indispensável minimizar possíveis sequelas devido a este ambiente adverso. Neste sentido, torna-se útil diminuir o teor de lactato.

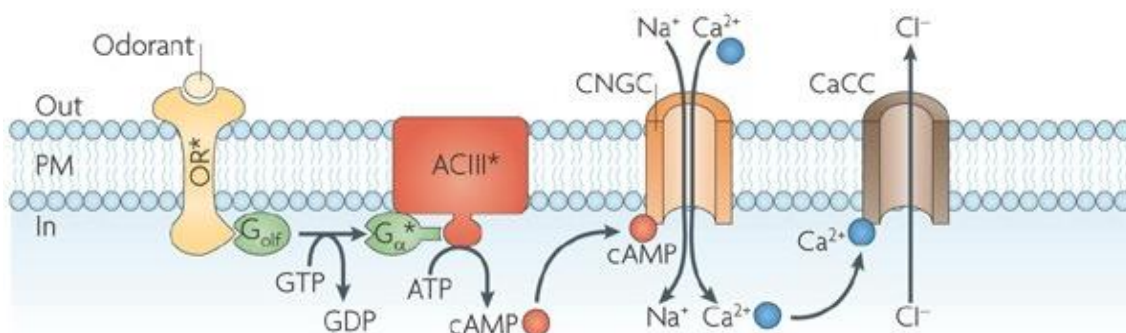


**Figura 4** - Na normoxia, o HIF1- $\alpha$  é hidroxilado e depois degradado pelo proteossoma. No entanto, na hipóxia, o suprimento de  $O_2$  leva à estabilização e complexação do HIF1- $\alpha$  com HIF1- $\beta$ . O complexo HIF1 $\alpha$ /HIF1- $\beta$  é transcricionalmente ativo e, após a ligação de vários coativadores, pode atingir genes específicos, incluindo aqueles envolvidos na autofagia, sobrevivência, proliferação e angiogénese. Adaptado de [42].

#### 1.4. Recetores olfativos no cancro

A capacidade de detetar compostos químicos no ambiente circundante e fazer ajustes comportamentais ou bioquímicos é fundamental para a sobrevivência da maioria dos organismos vivos. Os recetores olfativos (ORs) são recetores acoplados à proteína G (GPCRs) do domínio transmembranar, encontrados nos neurónios sensoriais olfativos, que funcionam como quimiossensores para a deteção de odorantes voláteis [70]. Em mamíferos, a transdução de sinal é iniciada pela ativação da via da adenosina monofosfato cíclica (cAMP), mediante a estimulação dos ORs pelos seus ligandos e a ativação de uma espécie de proteína G específica da via olfativa, Golf (Figura 5). Após ativação, esta subunidade proteica liga-se e ativa a adenilato ciclase específica do olfato - adenilato ciclase do tipo 3 - que é predominantemente expressa nos neurónios olfativos e promove a geração de cAMP, a partir de moléculas de ATP [71]. O aumento de cAMP intracelular

leva a um influxo externo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ , ativando um canal dependente de nucleótido cíclico seletivo por catião (CNGC), o que leva à despolarização da membrana. Esta despolarização inicial é, posteriormente, amplificada devido à ativação de canais de cloreto, ativados em resposta ao aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A despolarização leva à geração de potenciais de ação, bem como a libertação de neurotransmissores no terminal sináptico, no glomérulo do bulbo olfativo [70-71].



**Figura 5** - Transdução de sinal em neurónios olfativos em mamíferos. A ligação de uma molécula de odor ao OR ativa sucessivamente a proteína G trimérica específica para olfato (Golf), adenilil ciclase tipo III (ACIII), o CNGC e um canal Cl ativado por  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC). A ativação dos dois tipos de canais, leva à despolarização. Adaptado de [72].

Os ORs foram inicialmente identificados no epitélio olfativo, onde cada neurónio contém um único OR. No entanto, uma única molécula de odor pode ativar vários recetores e despoletar diferentes perceções do mesmo odor [73]. Posteriormente, verificou-se que os genes OR humanos também são expressos ectopicamente em diversos tecidos humano, de ratinho de rato, não sensoriais [73]. Esta observação levantou a possibilidade de que estes recetores poderiam ter funções fisiológicas em tecidos não olfativos e que, ao serem ativados por ligandos químicos (como pequenas aminas, hormonas, quimiocinas e odores), podem provocar uma enorme variedade de respostas celulares, entre elas alterações na forma celular e na adesão, bem como alterações na proliferação celular [74]. Evidências recentes apoiam o papel dos ORs no controlo do crescimento celular normal e aberrante [75] uma vez que a transdução de sinal que é mediada por segundos mensageiros, como iões  $\text{Ca}^{2+}$ , regula a proliferação, diferenciação, apoptose, migração e metabolismo de células cancerígenas [76][73]. Deste modo, muitos ORs têm sido detetados em tumores e servem como marcadores para a carcinogénese ou sido associados ao controlo da proliferação e apoptose em diferentes tipos de cancro. As suas principais funções em órgãos não olfativos incluem a regulação da proliferação celular, transporte e metabolismo [73]. O OR51E2 é provavelmente o OR mais estudado e um bom exemplo da pleiotropia de funções desencadeadas por um único OR em diversos órgãos. Este recetor é também conhecido como um recetor acoplado à proteína G

específico da próstata, devido à sua alta expressão neste tipo de cancro, nomeadamente na linha celular de cancro da próstata LNCaP e em células primárias do epitélio da próstata humana. O OR51E2 liga-se a derivados de androstenona e  $\beta$ -ionona, reduzindo a proliferação de células cancerígenas da próstata [77]. No entanto, outros autores, revelaram que após a estimulação com  $\beta$ -ionona, esse recetor provocou proliferação e invasividade das células cancerígenas da próstata [78][79]. Para além disso, efeitos semelhantes foram observados em células epiteliais pigmentares da retina [80]. O OR51E2 também é regulado positivamente em células de melanoma em comparação com melanócitos normais e a ativação do mesmo inibiu o crescimento de células de melanoma por meio de processos apoptóticos [76]. Também em células do pulmão, o OR51E2 liga-se ao propionato, diminuindo a taxa de remodelação do citoesqueleto, bem como a proliferação de células do músculo liso das vias aéreas humanas [81]. Dados recentes obtidos a partir de *microarrays* e de sequenciação de RNA de GMB e mostram que estes tumores expressam o OR51E2. Os genes homólogos deste OR são expressos em murganhos e em ratos (Olf78 e Olf59, respetivamente). A maioria dos ORs permanece sem ligandos identificados, no entanto, os que se conhecem incluem moléculas voláteis e outras moléculas endógenas ou exógenas, como por exemplo: ácidos gordos de curta cadeia (acetato e propionato) e odores sintéticos: lyral e Sandalore® [73]. O lactato, um metabólito que advém do processo da glicólise e que se acumula em situações de hipóxia, ativa o Olf78 induzindo aumentos dos níveis de cálcio nas células glómicas e estimulando a atividade do nervo do seio carotídeo. Este estudo, revelou que o OR51E2 é sensível ao lactato em situações de hipóxia [82]. Essas variações nos níveis de lactato no líquido cefalorraquidiano são comuns em pacientes com doença neurodegenerativa e meningite [83] e podem ser detetadas por este recetor olfativo. Portanto, é do maior interesse estudar os efeitos da ativação do OR51E2 no metabolismo glicolítico das células de GBM, uma vez que responde ao lactato.

# Objetivo

---

## II. Objetivo

Dados recentes obtidos a partir da análise de bases de dados de *microarrays* e de sequenciação de RNA de GBM, sugeriram que estes tumores expressam o recetor olfativo 51E2 (OR51E2). Tendo este recetor a capacidade de ligar lactato – produto da glicólise – e tendo o lactato sido implicado na modulação da proliferação e invasão de outros tumores, propõe-se que o OR51E2 possa funcionar como sensor da disponibilidade de lactato no microambiente tumoral e, desse modo, modelar o metabolismo celular.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão do OR51E2 em linhas celulares de GBM e avaliar a sua importância na viabilidade das mesmas em situações de normóxia/hipóxia e elevada/baixa concentração de glucose. Por outro lado, pretendeu-se também analisar o efeito do silenciamento deste recetor na produção de lactato como medida da glicólise aeróbica ou efeito de Warburg.

# Materiais e Métodos

---

## III. Materiais e métodos

### 3.1. Cultura Celular

#### 3.1.1. Linhas celulares e condições de cultura

Três linhas celulares humanas de glioblastoma multiforme com diferentes graus de proliferação – U-87MG, SNB-19 e U-373MG – foram utilizadas para a realização deste estudo. As células foram mantidas em cultura em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose* (DMEM, Gibco™), suplementado com 10% de soro fetal de bovino (FBS) e 0.1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich), e mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Além das linhas celulares de GBM, foi também usada uma linha celular humana de astrócitos, HASTR/ci35, a qual foi mantida a 33°C sob uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em *Astrocyte Medium* (Gibco™) suplementado com 1% N<sub>2</sub> supplement, 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina e 4 µg/mL blasticidina S (Abcam).

#### 3.1.2. Passagem de células

Sempre que se atingiu uma confluência celular de cerca de 70-90%, foi realizada a passagem celular, de modo a diminuir a densidade celular e garantir a expansão contínua das linhas celulares. No caso das U-87MG, SNB-19 e U-373MG, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril 1x. O PBS foi removido e substituído por uma solução de tripsina/ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,25% num volume que assegura a cobertura total das células, e foram incubadas por 3 a 5 minutos a 37°C. Quando a maioria das células se soltaram, foi adicionado um volume de meio completo para neutralizar a tripsina que tem de ser igual ou superior ao volume de tripsina utilizado. As células ressuspensas foram recolhidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas por 5 minutos, a 1200 rpm. O sobrenadante foi removido e as células foram transferidas para um *T-flask* contendo meio completo e colocadas na incubadora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Por outro lado, as células HASTR/ci35 foram lavadas com *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) que, posteriormente, foi substituído por tripsina:DPBS (1:4) durante 5 minutos a 33°C. Para travar a ação da tripsina foi adicionado meio completo. A suspensão celular foi recolhida e centrifugada por 3 minutos, a 120 g. O sobrenadante foi removido e as células foram transferidas para um *T-flask* contendo meio completo e incubadas (33°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### 3.1.3. Contagem de células

Para a realização das experiências foi necessário proceder à contagem do número total de células da suspensão celular. Para tal, parte da suspensão celular foi combinada com azul de tripano, e 10  $\mu$ L foram transferidos para uma câmara *Neubauer*. Após contagem das células nos diferentes quadrantes, estimou-se o número de células por mL e o número total de células no frasco de cultura, através das seguintes fórmulas:

$$\text{N}^\circ \text{ células/mL} = \text{média de células}_{\text{quadrantes}} \times 2 \times 10^4$$

$$\text{N}^\circ \text{ total de células} = \text{n}^\circ \text{ células/mL} \times V_{\text{ressuspensão celular}}$$

### 3.2. Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada a partir das linhas celulares de astrócitos humanos e glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG). Todo o procedimento foi efetuado em gelo para evitar degradação do RNA. Além disso, para evitar a ação das ribonucleases é necessário utilizar fortes agentes desnaturantes, que efetuam lise celular e inativam as RNases, e água tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC). A extração de RNA foi efetuada utilizando tripleXtractor (Grisp, Portugal), de acordo com as recomendações do fabricante (1 mL tripleXtractor/25  $\text{cm}^2$ ). Assim, adicionou-se tripleXtractor a cada microtubo contendo as células e homogeneizou-se manualmente com um pilão de forma a permitir o rompimento celular e a dissolução dos vários componentes celulares. Após uma incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente, que permitiu a completa dissociação de complexos de nucleoproteínas, adicionou-se o clorofórmio (200  $\mu$ L de clorofórmio/1 mL de tripleXtractor) e homogeneizou-se a amostra por inversão. As amostras foram então incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas posteriormente a 4°C durante 15 minutos a 12000 g. Após centrifugação, a solução separou-se em três fases: no fundo do tubo obteve-se a fase orgânica (cor rosada) contendo as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio; a interfase contendo o DNA; e a fase aquosa (transparente), contendo o RNA. Deste modo, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo ao qual se adicionou o isopropanol (500  $\mu$ L de isopropanol/1mL de tripleXtractor) e misturou-se por inversão, de forma a permitir a recuperação do RNA por precipitação. Após incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 4°C durante 10 minutos a 12000 g, rejeitou-se o sobrenadante. O RNA, sob forma de um precipitado branco, foi lavado duas vezes com 500  $\mu$ L de etanol 75% em água DEPC (-20°C), centrifugado a 4°C durante 5 minutos a 7500 g, tendo-se rejeitado o sobrenadante. Por fim, retirou-se o etanol excedente e o precipitado de RNA total foi reidratado em água DEPC e armazenado a -80°C para uso posterior. A integridade do RNA total foi analisada por uma eletroforese em gel de

agarose a 1.5% corado com GreenSafe (NZYTech, Portugal), em Tampão TAE 1x diluído em água DEPC. As amostras foram preparadas com 2 µL de RNA total, 8 µL de H<sub>2</sub>O estéril e 2 µL de *loading buffer* 10x, e depositadas no gel. Após a corrida da eletroforese a 100 V durante 30 minutos, visualizou-se o gel no transiluminador UVITEC (UVitec Cambridge, Reino Unido). A qualidade do RNA foi confirmada pela presença de 2 bandas de rRNA – 18S e 28S – em que a banda 28S apresentava aproximadamente o dobro da intensidade da 18S. Caso o RNA estivesse degradado, esta proporção estaria alterada, podendo mesmo observar-se arrastamento. A quantificação do RNA total foi realizada utilizando o nanoespectrofotômetro Nanophotometer™ (Implen, Alemanha), que fornece a concentração de RNA (µg/µL) e a razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, que indica o grau de pureza do RNA com base na leitura de absorvência a 260 e 280 nm, comprimentos de onda aos quais os ácidos nucleicos e as proteínas absorvem. Considera-se que o RNA está puro quando a razão entre as absorvências se encontrar no intervalo entre 1,8 e 2,1.

### 3.3. Síntese de cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total, com transcriptase reversa, na presença de iniciadores de síntese (*primers*). Utilizou-se a enzima *NZYM-MuLV Reverse Transcriptase* (NZYTech, Portugal), seguindo as instruções do fabricante. Preparou-se uma MIX num microtubo, contendo 1µg RNA, 1 µL de Random Primers e 2 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), por cada amostra. De seguida, incubou-se durante 5 minutos a 65°C num termociclador e adicionaram-se 2 µL de 10x *Reaction buffer* e 1 µL de *NZY M-MuLV Reverse Transcriptase* a cada microtubo. Os microtubos foram então colocados no termociclador e incubados a 37°C durante 50 minutos, seguidos de inativação da reação por aquecimento a 70°C durante 15 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

### 3.4. PCR da Transcrição reversa

A técnica de amplificação enzimática de DNA do produto da Transcrição Reversa – *Polimerase Chain Reaction* (PCR), permitiu confirmar a expressão do gene OR51E2 nas linhas celulares de astrócitos (HASTR/ci35) e glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG). A escolha dos *primers forward* (Fw: ATGGGCGTGGACGTAATGTT) e *reverse* (Rv: GAAGGCGAGTACCACACCAA) foi realizada através do programa Primer-Blast. De forma a amplificar enzimaticamente as sequências correspondentes ao mRNA do gene em estudo, realizou-se PCR utilizando a enzima *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYtech, Portugal), segundo as instruções do fabricante. Por cada reação adicionaram-

se 5  $\mu\text{L}$  de NZYTa<sub>q</sub> II 2 $\times$  Green Master Mix, 0.3  $\mu\text{L}$  de *primer forward* (10  $\mu\text{mol}$ ) e 0.3  $\mu\text{L}$  de *primer reverse* (10  $\mu\text{mol}$ ). Por fim, perpez-se com água estéril para um volume total de 9  $\mu\text{L}$ . A cada reação foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de cDNA (2  $\mu\text{L}$  de cDNA no caso da linha celular U-87MG), à exceção do negativo ao qual foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de água estéril. A amplificação do gene OR51E2 foi efetuada num termociclador, no qual as amostras foram colocadas a 95°C durante 3 minutos para ocorrer a desnaturação inicial. Seguiram-se 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, seguidas de 58°C (temperatura ótima de emparelhamento dos *primers* ao DNA) durante 45 segundos, 72°C durante 30 segundos para que ocorresse a amplificação, e finalmente 72°C durante 5 minutos. Os produtos amplificados foram depois visualizados por eletroforese em gel de agarose 1.5% na presença de GreenSafe, como descrito anteriormente. No primeiro poço foram depositados 3  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular GRS Ladder 50bp (Grisp, Portugal). Após visualização no transiluminador, os produtos PCR devidamente amplificados foram enviados para sequenciação à empresa STAB VIDA (Portugal), e as sequências correspondentes aos genes em estudo foram confirmadas através do programa NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), por comparação com as sequências da base de dados de *Homo sapiens*.

### **3.5. Imunohistoquímica**

As amostras de astrocitomas humanos (grau I-IV) foram gentilmente cedidas pelo Doutor Isidro Ferrer Abizanda do Institute of Neuropathology Brain Bank (HUB-ICO-IDIBELL Biobank), obtidas de acordo com as orientações da legislação espanhola (Real Decreto 1716/2011) e a aprovação da comissão de ética local do Hospital Universitário Bellvitge-IDIBELL, e embebidas em parafina. As lâminas com os cortes histológicos de amostras de astrocitomas humanos (graus I a IV) foram pré-tratadas com Trilogy™ (Cell Marque™, Millipore Sigma), uma solução que combina desparafinação, rehidratação e recuperação antigénica, de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com uma solução salina tamponada com Tris Base contendo 0.1% de Tween-20 (TBS-T), a atividade das peroxidases endógenas foi bloqueada com uma solução contendo 3% de peróxido de hidrogénio durante 10 minutos à temperatura ambiente. As lâminas com os cortes histológicos foram depois lavadas duas vezes com TBS-T e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo primário OR51E2 (diluição 1:750). Após duas lavagens com TBS-T, as lâminas foram tratadas com HiDef Detection™ HRP Polymer System (Cell Marque™, Millipore Sigma, Portugal). Inicialmente, os cortes histológicos foram incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente com HiDef Detection™ Amplifier, lavadas duas vezes com TBS-T, seguidas de incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente com HiDef Detection™ HRP Polymer Detector. Após

lavagens com TBS-T, a imunoreatividade foi testada com diaminobenzidina durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem com TBS-T, as lâminas com os cortes histológicos foram marcadas com hematoxilina durante 3 minutos à temperatura ambiente, de forma a permitir a visualização dos núcleos. Os controlos negativos, sem anticorpo primário, foram tratados nas mesmas condições descritas acima. Depois de desidratadas, as lâminas foram montadas e as imagens adquiridas num microscópio Zeiss Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Alemanha) utilizando uma magnificação de 20x.

### **3.6. Extração de proteína**

Para efetuar a extração da proteína total, as células foram homogeneizadas em tampão de lise – *radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA) - contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) e cocktail de inibidores de proteases (Roche). As suspensões foram centrifugadas a 7.000g por 10 min a 4°C e recuperou-se o sedimento. A quantificação de proteína total extraída foi realizada com o Pierce BCA Protein Assay Kit, seguindo as instruções do fabricante, por leitura da absorvância a 562 nm num leitor de microplacas. Para a quantificação, foi traçada uma reta de calibração de uma diluição sucessiva (0-1500 mg/mL) de BSA.

### **3.7. Western Blotting**

A técnica de *western blotting* possibilita a deteção e quantificação relativa de uma proteína específica, partindo de extratos de proteína total. O princípio base deste método depende da reação do anticorpo com o epítipo antigénico da proteína que se pretende estudar, a qual se encontra imobilizada sobre uma membrana de nylon ou de nitrocelulose. Neste trabalho procedeu-se ao *western blotting* para avaliar os níveis de expressão do OR51E2 nas diferentes linhas celulares (HASTR/ci35, U-87MG, SNB-19 e U-373MG). Realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, com SDS, do seguinte modo: a 30 µg de proteína total adicionou-se a *loading buffer* contendo 4% de β-mercaptoetanol, um agente desnaturante responsável por quebrar as ligações dissulfureto das proteínas. De seguida, o extrato proteico foi desnaturado por 10 min a 95°C e, posteriormente, separados de acordo com o seu peso molecular utilizando-se também um marcador de pesos moleculares (GRS Protein Marker MultiColour, GRiSP, Portugal). Após a eletroforese, foi efetuada uma eletrotransferência das proteínas do gel para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF), que foi bloqueada com 5% de leite desnatado, em TBS, por 1h à temperatura ambiente, de forma a impedir ligações inespecíficas dos anticorpos às membranas. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário *rabbit* anti-OR51E2 (Sigma-Aldrich, Merck)

diluído 1:1000 em TBS-T. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T e incubada com o anticorpo secundário anti-*rabbit* 1:20 000 (ThermoFisher Scientific) por 1h à temperatura ambiente. Depois da lavagem com TBS-T, a detecção do sinal foi realizada com o substrato SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific) e as imagens adquiridas num ChemiDoc™ MP (Bio-Rad, EUA), utilizando o *software* ImageLab. De forma a proceder à quantificação relativa da proteína do OR51E2, a membrana foi incubada durante 1h30 com o anticorpo da  $\beta$ -actina (diluída 1:20 000 em TBS-T) à temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T e incubada com o anticorpo secundário anti-*mouse* (1:40 000) por 1h à temperatura ambiente. A detecção do sinal foi realizada como descrito anteriormente. No software ImageLab foi elaborada a quantificação da expressão relativa do OR51E2 normalizada para a  $\beta$ -actina através do rácio entre o volume interno da banda de interesse (OR51E2) e o volume interno da banda de  $\beta$ -actina correspondente.

### **3.8. Imunocitoquímica**

Às células foram semeadas em lamelas de 10 mm e deixadas em cultura até atingirem uma confluência de 60-70%. Após serem lavadas com PBS 1x, adicionou-se 4% de paraformaldeído (PFA), seguido de lavagens repetidas com agitação e incubação com *wheat-germ agglutinin* (WGA) diluído 1:200 em PBS por 15 min. Procedeu-se à permeabilização/bloqueio com 3% de BSA e 0,2% Triton X-100 por 1h à temperatura ambiente. De seguida, incubou-se com o anticorpo primário anti-OR51E2 1:100, a 4°C *overnight*. As células foram lavadas com PBS-Tween a 0,01% (PBS-T) e incubadas durante 1h à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário  $\alpha$ -*rabbit* 1:1000 (Sigma-Aldrich, Merck). A partir da incubação com o anticorpo secundário, todos os procedimentos foram realizados no escuro. As células foram novamente lavadas com PBS-T antes da incubação com corante Hoechst 33342 (Molecular Probes, EUA) diluído 1:1000. Finalmente, procedeu-se à montagem e as células foram visualizadas num microscópio confocal LSM 710 (Zeiss, Alemanha) numa objetiva de 63x.

### **3.9. Ensaio Normóxia e Hipóxia**

Nestas experiências utilizou-se a linha celular SNB-19. No primeiro dia, foram semeadas 10.000 células por poço em duas placas de 96 poços. Em cada placa, foram testadas duas condições distintas: *High Glucose* (HG, 4,5 g/L) e *Low Glucose* (LG, 1 g/L). Ao terceiro dia, o meio de cultura foi substituído pelos meios LG e HG. De seguida, uma placa de cultura foi mantida na incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> (normoxia, 20% O<sub>2</sub>), e a outra foi

mantida numa câmara de hipóxia (STEMCELL Technologies) a 37°C (1% O<sub>2</sub>) durante 48 horas. As condições de hipóxia foram atingidas através da injeção de uma mistura de 5% CO<sub>2</sub> e 95% N<sub>2</sub> durante 4 minutos.

### **3.10. Ensaio MTT**

O ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi realizado para determinar a viabilidade celular das diferentes linhas celulares, após o ensaio de normoxia e hipóxia descrito anteriormente. No final das experiências, os meios de cultura foram removidos e as células foram incubadas com 5 mg/mL MTT durante 3h30 a 37°C. De forma a dissolver os cristais de formazano formados, foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade ótica foi medida a 570 nm num leitor de microplacas.

### **3.11. Silenciamento do OR51E2**

De forma a estudar o efeito do silenciamento do OR51E2 nas células SNB-19, as mesmas foram transfetadas com um *small interfering* RNA (siRNA). Para isso, foram semeadas 20.000 células por poço em meio completo, durante 48 horas. Após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por meio sem antibiótico. No dia seguinte, as células foram transfetadas com Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Nestes ensaios, foram estabelecidas diferentes condições: (1) células não transfetadas; (2) *Mock* – células contendo apenas o agente de transfeção Lipofectamine 2000; (3) siScramble – células transfetadas com um siRNA *scramble*; e (4) siOR51E2 – células transfetadas com o siRNA específico de OR51E2. Após 6 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio HG ou LG. De seguida, as células foram submetidas a condições de normoxia e de hipóxia, como descrito anteriormente, durante 48h. De forma a confirmar o silenciamento do OR51E2, foram realizados ensaios de imunocitoquímica como descrito anteriormente, e a intensidade de fluorescência do OR51E2 foi quantificada no *software* ZEN 3.0 (Zeiss, Alemanha) em relação ao número de núcleos celulares marcados em cada campo. Posteriormente, de forma a avaliar a viabilidade celular nas células SNB-19 com o OR51E2 silenciado, foram realizados ensaios de MTT como descrito anteriormente nas secções 3.9 e 3.10. Para tal, foram semeadas 10.000 células por poço em meio completo, durante 48 horas. Após esse tempo, procedeu-se à transfeção de acordo com o descrito acima.

### 3.12. Quantificação do L-Lactato extracelular

Os meios de cultura das experiências de MTT descritas acima foram coletados e utilizados para a determinação do lactato extracelular, utilizando-se um kit comercial (Cayman Chemical), seguindo as instruções do fabricante. Este ensaio permitiu a detecção de L-Lactato num método baseado em fluorescência, no qual a Lactato Desidrogenase catalisa a oxidação do L-lactato a piruvato, com consequente redução do NAD<sup>+</sup> a NADH, que por sua vez reage com o substrato fluorescente e origina um produto fluorescente com comprimentos de onda de excitação de 530-540 nm e de emissão de 585-595 nm. Devido à presença da lactato desidrogenase nas amostras, e de forma a prevenir a conversão do lactato a piruvato, foi necessário proceder a uma desproteínização das amostras com 0.5 M ácido metafosfórico (MPA). As amostras foram centrifugadas a 10.000 g – 5 minutos – a 4°C, o sobrenadante removido e foram adicionados 50 µL de carbonato de potássio com o objetivo de manter o pH. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e o sobrenadante recolhido. Posteriormente, as amostras foram diluídas 1:2 numa solução tampão do ensaio. Numa placa de 96 poços preta opaca, depositaram-se 20 µL de amostras standard de concentração conhecida de L-lactato (0-1000 µM) e 20 µL das amostras de interesse, em duplicado. De seguida, adicionaram-se 100 µL de solução tampão, 20 µL de uma mix de cofator e 20 µL de substrato fluorescente. As reações foram iniciadas pela adição de 40 µL de mix enzimática, e as placas incubadas, protegidas da luz, durante 20 minutos à temperatura ambiente. A concentração de L-Lactato foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$L - Lactato(\mu M) = \left[ \frac{CF - (intercepção - y)}{declive} \right] \times 2 \times diluição da amostra$$

CF – fluorescência corrigida: valor de fluorescência de cada amostra ao qual foi subtraído o valor de fluorescência da amostra standard 0 µM de L-lactato

### 3.13. Análise estatística

Os dados apresentados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) de experiências separadas (n≥3) e comparados por análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida pelo teste *Tukey's* de comparações múltiplas utilizando o *software* GraphPad Prism. Considerou-se diferença estatisticamente significativa quando o valor de *p* foi inferior a 0,05.

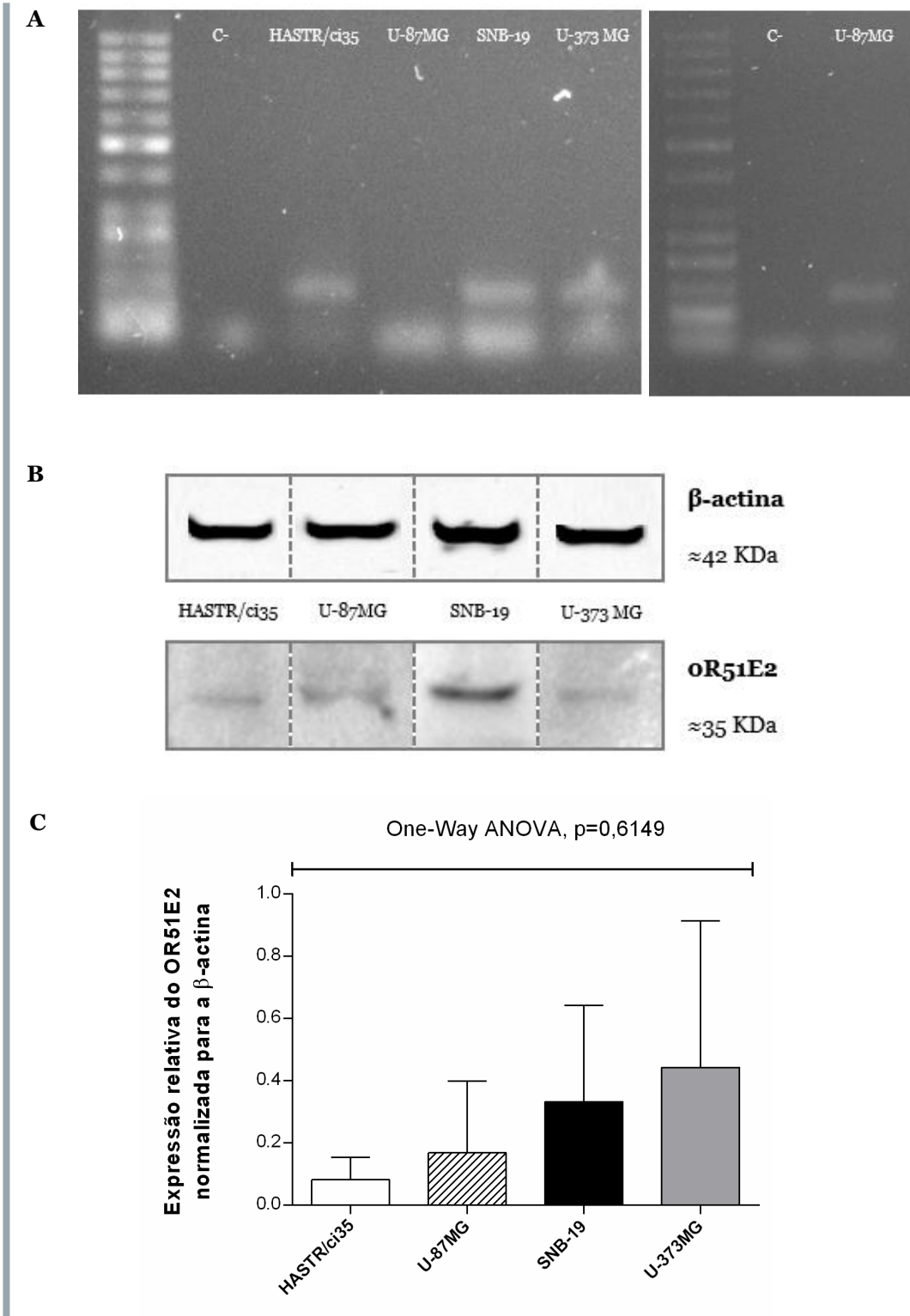
# Resultados

---

## IV. Resultados

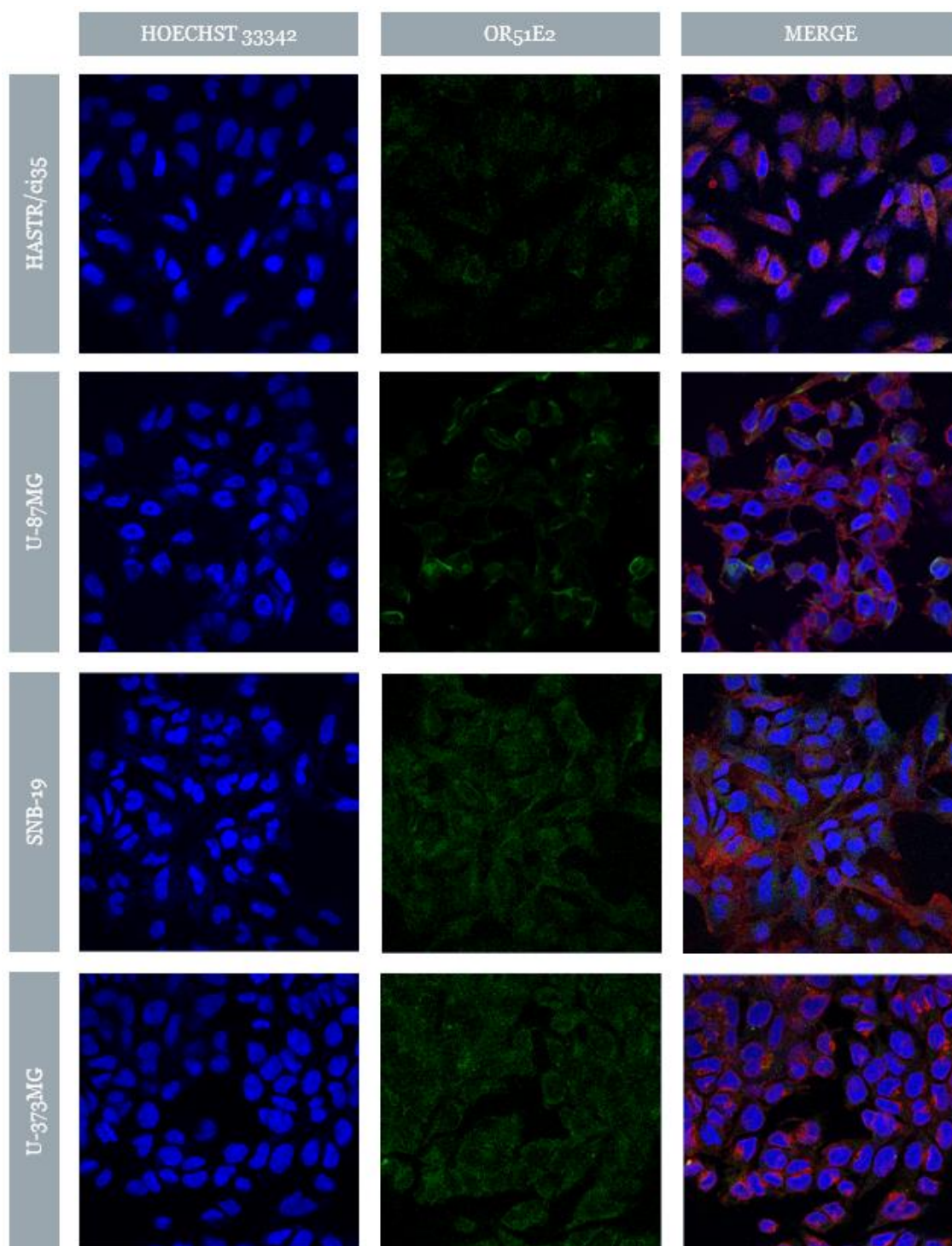
### 4.1. O recetor olfativo 51E2 é expresso em células de GBM

De forma a analisar a expressão do mRNA e da proteína do OR51E2 nas células de GBM, realizou-se RT-PCR, *western blotting*, imunocitoquímica e imunohistoquímica. Primeiramente, a expressão de mRNA do OR51E2 foi confirmada por RT-PCR na linha celular de astrócitos normais (HASTR/ci35) e em três linhas celulares de GBM (U-87MG, SNB-19 e U-373MG). Observou-se a amplificação de um fragmento com 135 bp, tal como previsto, em todas as linhas celulares em estudo. Posteriormente, por *western blotting*, procedeu-se à análise da expressão da proteína OR51E2 nas linhas celulares HASTR/ci35 e U-87MG, SNB-19 e U-373MG, tendo-se obtido uma banda de aproximadamente 36 kDa (Figura 6B), correspondente ao tamanho esperado da proteína. No entanto, não foi possível observar diferenças nos níveis de expressão da proteína entre as diferentes linhas celulares (Figura 6C). Após confirmação da expressão da proteína do OR51E2 nas diferentes linhas celulares, realizou-se um ensaio de imunocitoquímica de forma a observar a sua localização celular, tendo-se verificado que o OR51E2 é expresso predominantemente no citosol, embora também seja expresso na membrana plasmática (Figura 7A). Além disso, através da quantificação da intensidade de fluorescência (Figura 7B), parece observar-se uma maior expressão do OR51E2 nas linhas celulares mais proliferativas de glioblastoma nas SNB-19 ( $p < 0.0001$ ) e U-373MG ( $p < 0.0001$ ), relativamente às linhas celulares HASTR/ci35 e U-87MG. Por fim, procedeu-se à comparação dos níveis de expressão do OR51E2 em amostras humanas de astrocitomas de diferentes graus (I-IV), segundo a classificação da OMS. Esta técnica permitiu identificar a presença e a estudar a localização deste recetor em cortes histológicos de amostras humanas de astrocitoma pilocítico (graus I e II), de astrocitoma anaplásico (grau III) e de glioblastoma (grau IV) (Figura 8). Nos controlos negativos, não se observou qualquer marcação.

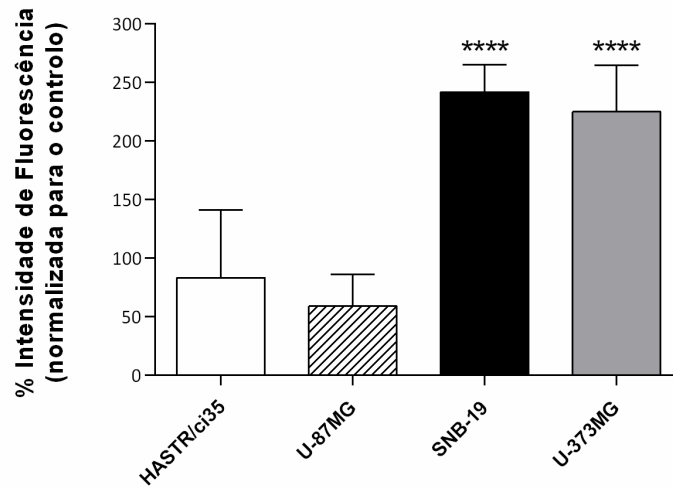


**Figure 6 – Análise da expressão de OR51E2.** (A) RT-PCR do OR51E2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GreenSafe dos produtos de PCR do gene OR51E2. Em cada uma das imagens encontra-se representado (da esquerda para a direita) o marcador de peso molecular, o controlo negativo (C-) e o fragmento relativo a cada linha celular. A análise de RT-PCR validou a expressão do OR51E2 nas diferentes linhas celulares. (B) *Western blotting* das proteínas OR51E2 e  $\beta$ -actina nas linhas celulares de astrócitos (HASTR/ci35) e de glioblastoma (U-87MG, SNB-19 e U-373MG), tendo-se obtido, como esperado, bandas de peso molecular aproximado de 36 KDa. (C) Expressão relativa do OR51E2 normalizada para a  $\beta$ -actina. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,6149$ ).

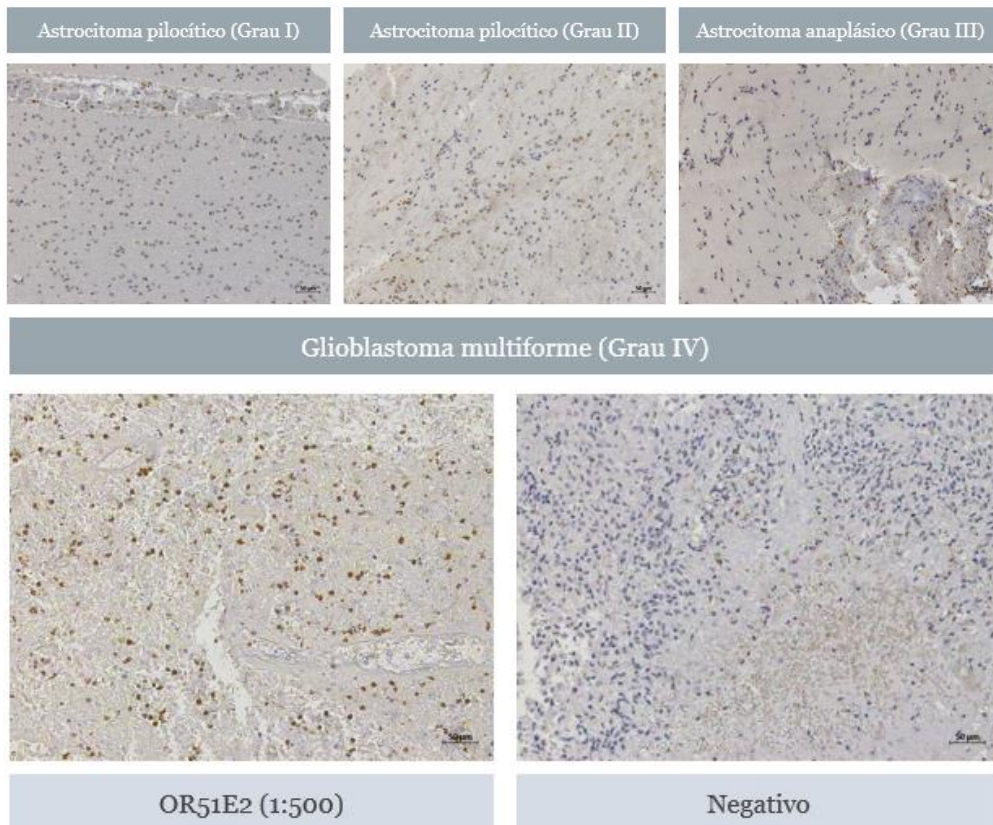
A



**B**



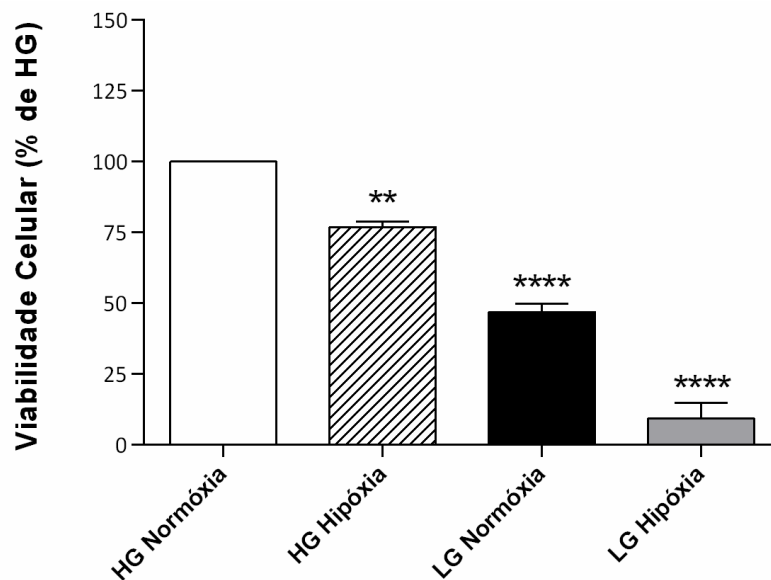
**Figura 7** – (A) Imagens obtidas por microscopia confocal de imunofluorescência do OR51E2 (verde) na linha celular HASTR/ci35 e nas linhas celulares de GBM. Os núcleos celulares (azul) foram marcados com Hoechst 33342. Foi possível observar uma localização maioritariamente intracelular do OR51E2. Barra de escala: 50  $\mu$ m. (B) Quantificação relativa da intensidade de fluorescência do OR51E2 nas linhas celulares de astrócitos normais e de GBM. Verificou-se uma maior expressão do OR51E2 nas linhas celulares SNB-19 e U-373MG ( $p < 0.0001$ ) relativamente às linhas celulares HASTR/ci35 e U-87MG.



**Figura 8** - Localização da proteína OR51E2 em amostras de astrocitomas humanos de diferentes graus por imunohistoquímica. As imagens representam cortes histológicos de amostras de astrocitomas pilocíticos (graus I e II), anaplásico, e de glioblastoma, incubadas com anticorpo primário anti-OR51E2 (diluído 1:500). As figuras apresentam uma escala de 50  $\mu$ m.

## 4.2. Condições de hipóxia e de baixa concentração de glucose induzem uma redução na viabilidade celular na linha SNB-19

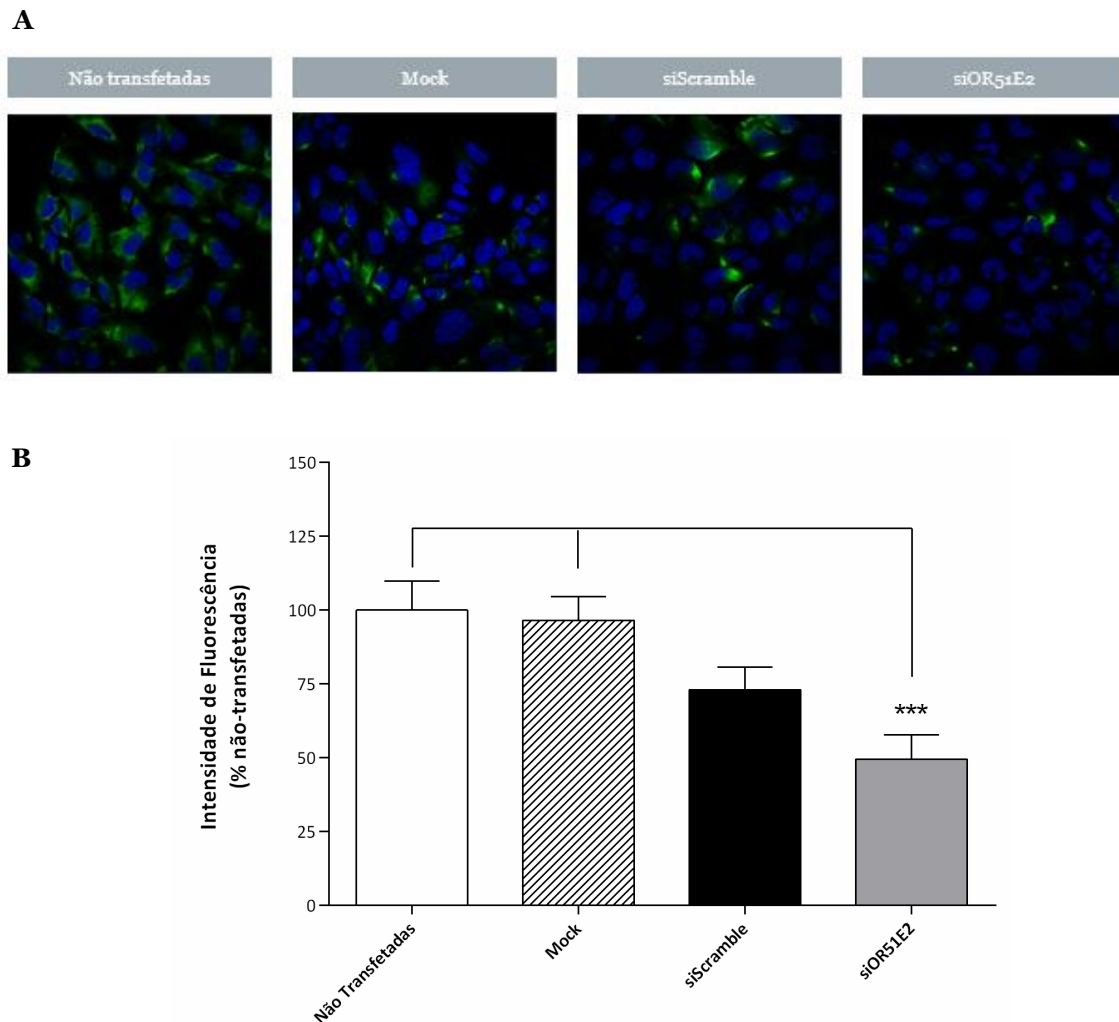
Todas as células dependem da absorção de nutrientes, que são direcionados para várias vias metabólicas para produzir energia, a fim de manter a homeostase celular. Neste sentido, a linha celular SNB-19 foi submetida à privação de glucose e oxigénio (hipóxia). A figura 10 diz respeito à percentagem da viabilidade celular na linha SNB-19 após privação de oxigénio e/ou glucose. Em situações de normóxia, a redução da concentração de glucose no meio (LG normóxia) levou a uma diminuição em cerca de 50% da viabilidade celular das SNB-19 ( $p < 0.0001$ ) relativamente ao controlo (HG normóxia). Adicionalmente, quando as células foram expostas à privação de oxigénio (HG hipóxia), ocorreu uma diminuição da viabilidade ( $p = 0.0032$ ) relativamente à condição de normóxia (HG normóxia). Por fim, e de acordo com o que seria expectável, as células sujeitas à privação de oxigénio e glucose (LG hipóxia), elementos estes essenciais à sobrevivência, sofreram uma diminuição na viabilidade celular de cerca de 90% ( $p < 0.0001$ ) em relação ao controlo (HG normóxia).



**Figura 9** – Ensaio de MTT para quantificação da viabilidade celular nas SNB-19 em condições de *Low/High* Glucose e Normoxia/Hipóxia durante 48 horas. Os dados foram comparados e expressos como média  $\pm$  SEM. Os gráficos de barras representam as médias  $\pm$  SEM, N = 4 e a análise estatística foi realizada usando two-way ANOVA (\*\*,  $p < 0.5$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

### 4.3. Silenciamento do OR51E2 na linha celular SNB-19

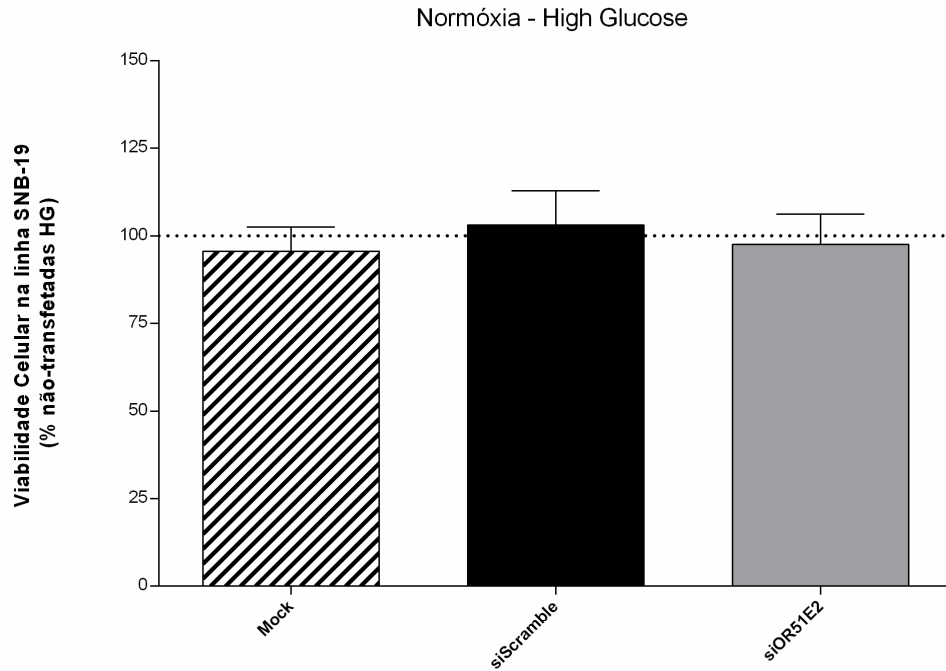
Numa tentativa de esclarecer se a proliferação de células de GBM pode ser mediada pelo OR51E2, procedeu-se ao silenciamento do gene OR51E2, com um siRNA específico, nas células SNB-19. O silenciamento do OR51E2 foi confirmado pela quantificação da intensidade de fluorescência (Figura 10A). Através da quantificação da intensidade de fluorescência (Figura 10B), foi possível observar que ocorreu uma diminuição significativa da fluorescência nas células transfetadas com siRNA OR51E2 ( $p < 0.0001$ ) relativamente às células não-transfetadas e às células *mock*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as células transfetadas com siRNA de OR51E2 e as células transfetadas com siRNA Scramble.



**Figura 10** – Silenciamento gênico do OR51E2 com siRNA específico. (A) Imagens obtidas através de microscopia confocal de imunofluorescência do OR51E2 na linha celular SNB-19 (verde). As células foram transfetadas com siRNA OR51E2 e um siRNA *Scramble*, observando-se uma diminuição da fluorescência nas células transfetadas com o siOR51E2. Os núcleos (azul) foram corados com Hoechst 33342. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência na linha celular SNB-19 após silenciamento do OR51E2. As células transfetadas com o siOR51E2 apresentam uma menor fluorescência relativamente às células não-transfetadas e *mock* ( $p < 0.0001$ ). Os gráficos de barras representam as médias  $\pm$  SEM,  $N = 4$  e a análise estatística foi realizada usando ANOVA.

Posteriormente, a viabilidade celular das SNB-19 após silenciamento de OR51E2 foi testada sob privação de glucose e/ou oxigénio. Em condições normais de oxigénio (HG normóxia e LG normóxia), a viabilidade celular não apresenta diferenças significativas entre *mock*, siScramble e siOR51E2 (Fig. 11A e 11B). Resultados semelhantes foram obtidos para as células sob privação de oxigénio (HG e LG hipóxia).

**A**



**B**

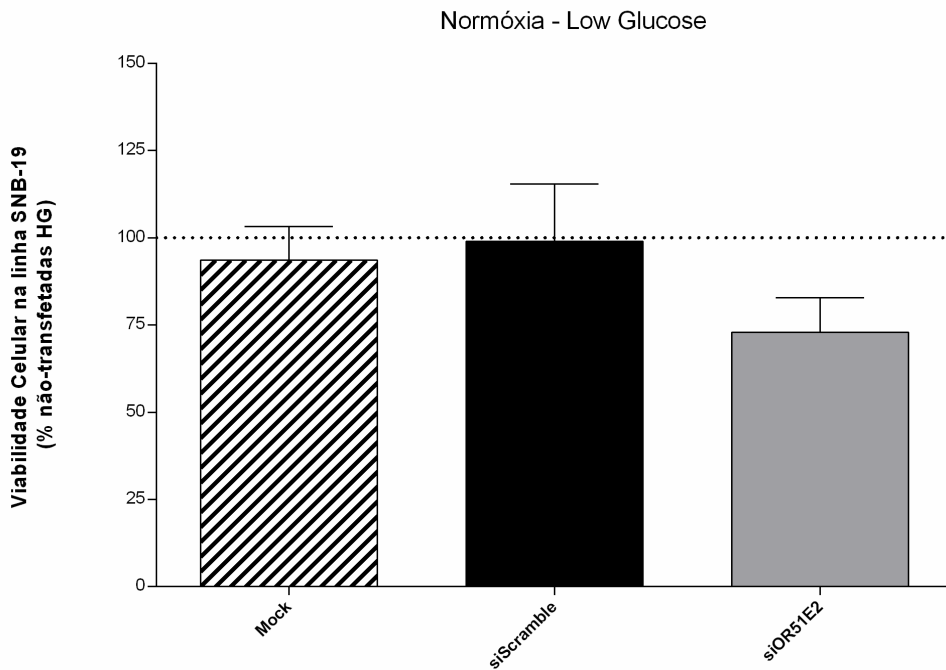
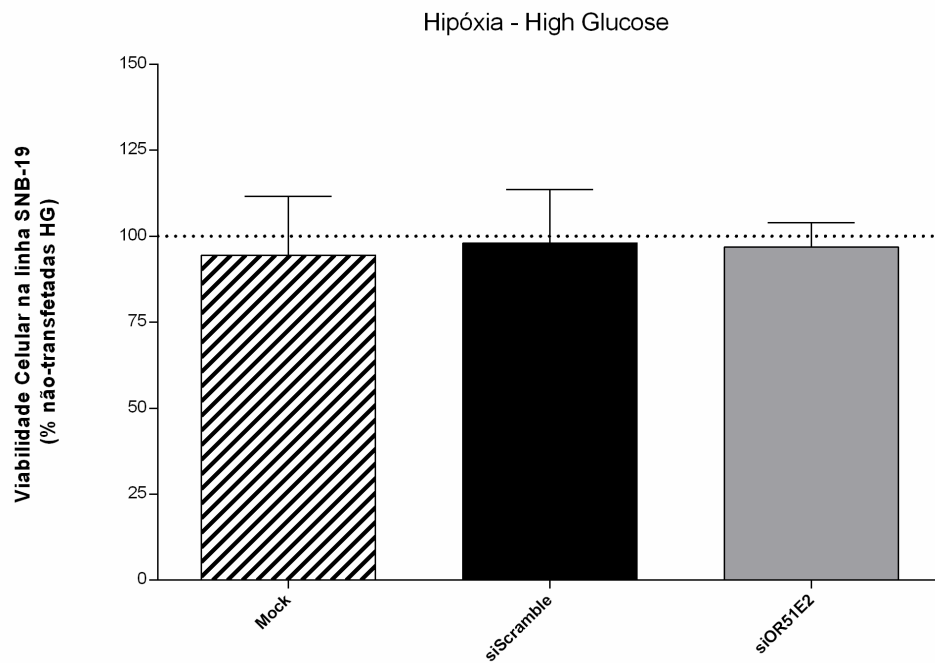


Figura 11 – Ensaio de MTT para quantificação da viabilidade celular na linha celular SNB-19 em Normóxia (A) *High* e (B) *Low* Glucose. A viabilidade celular não apresenta diferenças significativas entre as diferentes condições: *mock*, siScramble e siOR51E2. Os gráficos de barras representam as médias  $\pm$  SEM, N = 3.

**A**



**B**

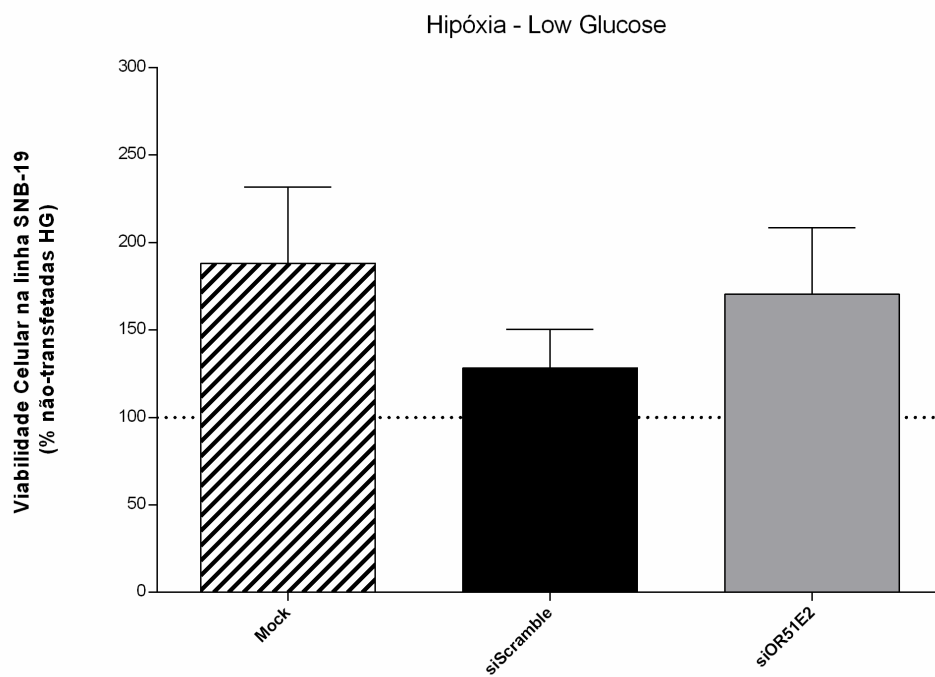


Figura 12 – Ensaio de MTT para quantificação da viabilidade celular na linha celular SNB-19 em Hipóxia (A) *High* e (B) *Low* Glucose. A viabilidade celular não apresenta diferenças significativas entre as diferentes condições: *mock*, siScramble e siOR51E2. Os gráficos de barras representam as médias  $\pm$  SEM, N = 3.

#### 4.4. Relação entre o silenciamento do OR51E2 e a concentração de lactato extracelular na linha SNB-19

Nas células tumorais, mesmo na presença de oxigênio, a glucose é metabolizada em lactato com o objetivo de fornecer substratos para a biossíntese de nucleotídeos, aminoácidos e NADPH que são utilizados na proliferação celular e manutenção de sobrevivência – efeito de Warburg. Sendo o OR51E2 ativado pelo lactato, procedeu-se à quantificação do L-lactato extracelular nos meios celulares das experiências de privação de glucose e oxigênio. Os resultados mostraram não haver diferenças significativas na concentração de L-lactato entre as diferentes condições.

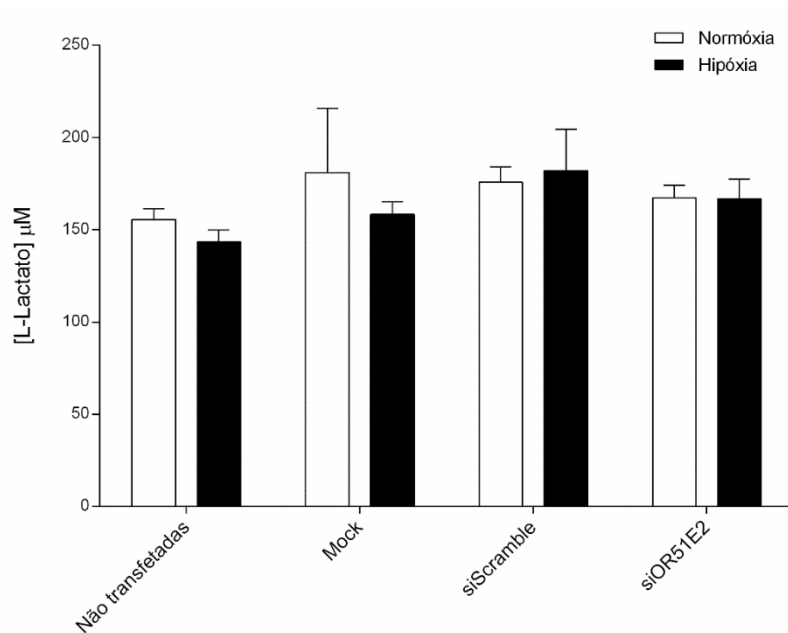


Figura 13 – Concentração de L-Lactato extracelular, sob condições de normóxia e hipóxia com o OR51E2 silenciado. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na concentração de L-Lactato nas diferentes condições.

# Discussão

---

## Discussão

O grande desafio no tratamento do GBM está na sua localização, a difícil delimitação dificulta a remoção completa deste tipo de tumor. As células de GBM interagem com o ambiente circundante, criando fortes interações entre grupos de células heterogêneas, várias quimiocinas com efeitos citogenéticos e proteínas extracelulares que estimulam a tumorigênese, expansão multifocal descontrolada e evasão imunológica [84]. Paralelamente, a taxa de crescimento extremamente rápida das células GBM após a excisão dos tumores é um dos fatores que contribui para a taxa de sobrevivência extremamente baixa após o diagnóstico [52]. Todas essas características devem ser levadas em consideração na procura de uma abordagem terapêutica mais adequada. Os perfis metabólicos das células cancerígenas diferem do das células normais e as células de GBM não são exceção [85]. Vários estudos mostraram que as células de GBM dependem amplamente da glicólise, em vez da fosforilação oxidativa – *Efeito Warburg* – para a produção de energia e que essa característica metabólica pode contribuir para a promoção de vias anabólicas necessárias para a divisão e proliferação celular. Por outro lado, a via glicolítica que leva à produção de lactato favorece uma acidificação do meio extracelular, o que contribui para a degradação da matriz e facilita a migração e invasão das células tumorais para os tecidos saudáveis adjacentes [86][87].

Tendo em vista novas abordagens terapêuticas, o presente trabalho centrou-se na análise do recetor olfativo OR51E2 no GBM. O OR51E2 pertence à família dos recetores olfativos e é expresso em vários tecidos humanos, como próstata, cólon, coração e mama [77][88][89]. Um estudo prévio, centrado na análise do papel do OR51E2 em melanócitos, revelou que este recetor afeta a proliferação, diferenciação e melanogênese dos mesmos. Já no cancro da próstata, demonstrou-se que o OR51E2, promove a invasão celular *in vitro* e a metástase *in vivo* [79]. Para além disso, como a expressão deste recetor é regulada positivamente em células de cancro da próstata humano em comparação com células epiteliais de próstata saudáveis, o OR51E2 poderá ser usado como um potencial biomarcador tumoral [87-90]. Este recetor não é apenas amplamente expresso, mas também é um dos ORs com maior expressão ao nível do mRNA [88]. Todos estes factos suportam a importância do tema central do presente estudo; investigar a expressão e a função do OR51E2 em células de GBM. Dados recentes, obtidos a partir de *microarrays* e de sequenciação de RNA de GBM, mostram que o OR51E2 é expresso neste tipo de tumor. O presente estudo mostrou a expressão génica e proteica do OR51E2 na linha HASTR/ci35 e em três linhas de GBM, U-87MG, SNB-19 e U-373MG, respetivamente por RT-PCR e *Western Blot*. Nos ensaios de ICC foi possível observar que este recetor se localiza predominantemente no citosol, embora também

esteja presente na membrana plasmática, o que é consistente com a literatura. A presença do OR51E2 além da membrana citoplasmática foi previamente demonstrada em células de cancro da próstata (LNCaP) e em endossomas de melanócitos [74][92]. Através da quantificação da intensidade de fluorescência, verificámos uma maior expressão deste recetor nas linhas celulares mais agressivas de GBM, SNB-19 e U-373MG. Para além disso, demonstrámos a expressão da proteína OR51E2 em células epiteliais de astrocitomas com vários graus de diferenciação. A expressão mais intensa da proteína OR51E1 é observada nas estruturas celulares luminais apicais, indicando um padrão de localização na membrana. No entanto, também apresenta expressão de forma difusa por todo o citoplasma das células epiteliais.

Todas as células dependem da absorção de nutrientes, que são direcionados para várias vias metabólicas para produzir energia, a fim de manter a homeostase celular. Os tumores sólidos apresentam regiões que não são irrigadas adequadamente e, isso acontece porque as células neoplásicas têm elevada taxa mitótica, formando camadas que se distanciam dos vasos sanguíneos adjacentes, reduzindo a captação de oxigénio e nutrientes. Essa condição é determinante tanto para a morte de grande parte dessas células, como para o processo de adaptação que leva à sobrevivência, relacionada com a expressão de genes que permitem a adaptação metabólica ao ambiente hostil. Deste modo, mimetizando esta situação, avaliámos o comportamento das SNB-19 perante condições de stress, onde promovemos a privação de glucose e de oxigénio. De acordo com o que seria expectável, as células sujeitas a estas condições, sofrem uma diminuição na viabilidade celular. Devido à contribuição significativa da reprogramação metabólica para a resistência à terapia com GBM, bem como para a capacidade de proliferação e migração, a modulação da atividade metabólica aparece como uma estratégia promissora para abordar o tratamento com GBM. Para além disso, numa tentativa de investigar se proliferação de células de GBM pode ser mediada pelo OR51E2, procedeu-se ao seu silenciamento nas SNB-19. O silenciamento foi avaliado pela quantificação da intensidade de fluorescência através de imunofluorescência. Deste modo, foi possível observar que ocorreu uma diminuição significativa da fluorescência nas células transfetadas com siOR51E2 ( $p < 0.0001$ ) relativamente às células não-transfetadas e às células *mock*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as células transfetadas com siOR51E2 e as células transfetadas com siScramble, o que leva a questionar a eficácia do silenciamento. Posteriormente, a viabilidade celular das SNB-19 com o OR51E2 silenciado foi testada sob privação de glucose e/ou oxigénio. Em condições normais de oxigénio (HG normóxia e LG normóxia), a viabilidade celular não apresentou diferenças significativas entre as diferentes condições: *mock*, siScramble e

siOR51E2. Resultados semelhantes foram obtidos para as células sob privação de oxigénio (HG e LG hipóxia).

Para evitar a acidificação intracelular, as células cancerosas exportam lactato por o meio extracelular o que permite que a glicólise aeróbica e a produção de lactato continuem, e simultaneamente que as concentrações extracelulares de ácido láctico aumentem [93]. Altas concentrações de lactato no ambiente extracelular estão associadas a um mau prognóstico [94]. A acumulação de ácido láctico no microambiente tumoral extracelular acidifica o meio devido aos iões  $H^+$ , criando assim um gradiente eletroquímico através da membrana plasmática das células cancerosas que promove a entrada ativa de vários nutrientes essenciais nas células cancerígenas [93]. Sendo o lactato um dos ligandos conhecidos do OR51E2, este poderá funcionar como sensor da disponibilidade de lactato no microambiente tumoral. Assim, decidimos quantificar o lactato nas diferentes condições testadas. Enquanto as concentrações fisiológicas de lactato no sangue e tecido normal estão na faixa de 1,5–3 mM, a libertação de lactato das células tumorais pode resultar em concentrações extracelulares até 40 mM [95]. Isso foi demonstrado por Fisher et al. em 2017 [96], que encontraram níveis elevados de lactato no soro de pacientes com diferentes tipos de cancro (cancro da mama, gastrointestinal, pulmonar e urogenital; melanoma; sarcoma; etc.). Os nossos resultados revelaram baixas concentrações extracelulares de lactato entre os 150-200  $\mu$ M. Para além disso, mostraram não haver diferenças significativas na concentração de L-lactato entre as diferentes condições em estudo. Contudo, estes ensaios são muito preliminares, sendo necessário uma investigação mais aprofundada neste sentido, e sobretudo uma reavaliação dos efeitos do silenciamento, após otimização das condições de transfeção com siRNA.

# Conclusão

---

## 5. Conclusão

A natureza extremamente complexa do GBM torna os estudos centrados neste tipo de tumor um grande desafio. No entanto, a quantidade crescente de conhecimento ao longo dos anos sobre as características específicas apresentadas por estes tumores, ajudou a desvendar novos alvos terapêuticos. O perfil metabólico do GBM aparece como um ponto crítico ligando uma série de características do cancro, incluindo a capacidade proliferativa, a capacidade de migração e invasão, e a regulação da apoptose. Sendo o OR51E2 ativado pelo lactato e expresso no GBM, avaliámos o seu papel neste tipo tumor. O uso de uma ferramenta versátil como o silenciamento génico com siRNAs, neste caso para o OR51E2, pareceu-nos uma abordagem relevante para avaliar o papel deste recetor olfativo. Esta dissertação permitiu confirmar que o OR51E2 é efetivamente expresso nas linhas HASTR/ci35, U-87MG, SNB-19, U-373MG, tanto a nível proteico como a nível do mRNA, sendo que a sua expressão é mais elevada nas linhas mais agressivas SNB-19 e U-373MG. Em condições de stress como privação de oxigénio e glucose, observou-se uma diminuição da viabilidade celular nas SNB-19. Na mesma linha celular, tentou-se o silenciamento do OR51E2. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as células transfetadas com siOR51E2 e as células transfetadas com siScramble, o que leva a questionar a eficácia do silenciamento. Em condições normais de oxigénio (HG normóxia e LG normóxia), a viabilidade celular não apresenta diferenças significativas entre as diferentes condições: *mock*, siScramble e siOR51E2. Resultados semelhantes foram obtidos para as células sob privação de oxigénio (HG e LG hipóxia). Relativamente ao lactato extracelular, os resultados revelaram não haver diferenças significativas na concentração de L-lactato entre as diferentes condições, o que sugere não haver diferenças entre os níveis de glicólise, tanto em condições de normoxia como de hipoxia, e também a não interferência do OR51E2 no processo. A atividade de silenciamento de genes de um siRNA é dependente da linha celular, que se correlaciona com o nível de expressão de mRNA [97]. Sabe-se que ao modular o nível de mRNA alvo, os genes altamente expressos são os mais suscetíveis ao silenciamento. O que sugere que a abundância do mRNA alvo é um fator crítico que determina a eficácia do silenciamento génico mediado por siRNA num determinado contexto celular [97]. Deste modo, concluímos que a abundância do mRNA juntamente com a linha SNB-19, pode ter sido um fator crucial para não se ter obtido diferenças significativas. Uma vez que estes ensaios são muito preliminares, será necessário uma investigação mais aprofundada e uma reavaliação dos efeitos do silenciamento, após otimização das condições de transfeção com siRNA. Contudo, concluímos que o OR51E2 é expresso em células de GBM e a suscetibilidade destas células a condições de stress como os baixos níveis de glucose e oxigénio que reduz significativamente a sua viabilidade.

# Bibliografia

---

## 6. Bibliografia

- [1] W. Globocan Observatory, “Cancer Today - World,” *Int. Agency Res. Cancer*, vol. 876, pp. 2018–2019, 2019.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [3] F. G. Frost, P. F. Cherukuri, S. Milanovich, and C. F. Boerkoel, “Pan-cancer RNA-seq data stratifies tumours by some hallmarks of cancer,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 24, no. 1, pp. 418–430, 2020, doi: 10.1111/jcmm.14746.
- [4] M. A. Lemmon and J. Schlessinger, “Cell signaling by receptor-tyrosine kinases,” vol. 141, no. 7, pp. 1117–1134, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.Cell.
- [5] M. A. Feitelson *et al.*, “Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 35, pp. S25–S54, 2015, doi: 10.1016/j.semcancer.2015.02.006.
- [6] N. Cheng, A. Chytil, Y. Shyr, A. Joly, and H. L. Moses, “TGF- $\beta$  signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion,” *Mol. Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 1521–1533, 2009, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2203.TGF-.
- [7] N. A. Bhowmick, E. G. Neilson, and H. L. Moses, “Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression,” *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 332–337, 2004, doi: 10.1038/nature03096.
- [8] A. Yaghoubi, M. Ghojzadeh, S. Abolhasani, H. Alikhah, and F. Khaki-Khatibi, “The Chemopreventive Activity of Indonesia Medicinal Plants Targeting on Hallmarks of Cancer,” *J. Cardiovasc. Thorac. Res.*, vol. 7, no. 3, pp. 113–117, 2015, doi: 10.15171/jcvtr.2015.24.
- [9] W. H. Talib, “Melatonin and cancer hallmarks,” *Molecules*, vol. 23, no. 3, 2018, doi: 10.3390/molecules23030518.
- [10] S. Matt and T. G. Hofmann, “The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 73, no. 15, pp. 2829–2850, 2016, doi: 10.1007/s00018-016-2130-4.
- [11] S. W. G. Tait and D. R. Green, “Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 9, pp. 621–632, 2010, doi: 10.1038/nrm2952.
- [12] J. Wiezorek, P. Holland, and J. Graves, “Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, no. 6, pp. 1701–1708, 2010, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1692.

- [13] A. Mancini *et al.*, “Disruption of the  $\beta$ 1L Isoform of GABP Reverses Glioblastoma Replicative Immortality in a TERT Promoter Mutation-Dependent Manner,” *Cancer Cell*, vol. 34, no. 3, p. 513–528.e8, 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.08.003.
- [14] Z. Koohini, Z. Koohini, and S. Teimourian, “Slit/Robo Signaling Pathway in Cancer; a New Stand Point for Cancer Treatment,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 25, no. 4, pp. 1285–1293, 2019, doi: 10.1007/s12253-018-00568-y.
- [15] S. Li *et al.*, “Angiogenesis in pancreatic cancer: current research status and clinical implications,” *Angiogenesis*, vol. 22, no. 1, pp. 15–36, 2019, doi: 10.1007/s10456-018-9645-2.
- [16] J. A. Nagy, S. H. Chang, S. C. Shih, A. M. Dvorak, and H. F. Dvorak, “Heterogeneity of the tumor vasculature,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 36, no. 3, pp. 321–331, 2010, doi: 10.1055/s-0030-1253454.
- [17] C. Befani and P. Liakos, “The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 12, pp. 9087–9098, 2018, doi: 10.1002/jcp.26805.
- [18] D. Liao and R. S. Johnson, “Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 26, no. 2, pp. 281–290, 2007, doi: 10.1007/s10555-007-9066-y.
- [19] W. and K. Lu and Yibin, “Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 1, pp. 100–106, 2016, doi: 10.1016/j.devcel.2019.04.010.Epithelial-mesenchymal.
- [20] S. H. M. Wong, C. M. Fang, L. H. Chuah, C. O. Leong, and S. C. Ngai, “E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 121, no. October 2017, pp. 11–22, 2018, doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010.
- [21] I. Pastushenko *et al.*, “Identification of the tumour transition states occurring during EMT,” *Nature*, vol. 556, no. 7702, 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0040-3.
- [22] N. M. Aiello and Y. Kang, “Context-dependent EMT programs in cancer metastasis,” *J. Exp. Med.*, vol. 216, no. 5, pp. 1016–1026, 2019, doi: 10.1084/jem.20181827.
- [23] B. De Craene and G. Berx, “Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 2, pp. 97–110, 2013, doi: 10.1038/nrc3447.
- [24] C. Ribeiro-Silva, W. Vermeulen, and H. Lans, “SWI/SNF: Complex complexes in genome stability and cancer,” *DNA Repair (Amst.)*, vol. 77, no. March, pp. 87–

- 95, 2019, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.03.007.
- [25] J. Korkola and J. W. Gray, “Breast cancer genomes - form and function,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 20, no. 1, pp. 4–14, 2010, doi: 10.1016/j.gde.2009.11.005.
- [26] C. I. Diakos, K. A. Charles, D. C. McMillan, and S. J. Clarke, “Cancer-related inflammation and treatment effectiveness,” *Lancet Oncol.*, vol. 15, no. 11, pp. e493–e503, 2014, doi: 10.1016/S1470-2045(14)70263-3.
- [27] S. Shalapour, M. Karin, S. Shalapour, and M. Karin, “Immunity , inflammation , and cancer : an eternal fight between good and evil Find the latest version : Immunity , inflammation , and cancer : an eternal fight between good and evil,” *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 9, pp. 3347–3355, 2015, doi: 10.1172/JCI80007.
- [28] H. T. Marshall and M. B. A. Djamgoz, “Immuno-oncology: Emerging targets and combination therapies,” *Front. Oncol.*, vol. 8, no. AUG, pp. 1–29, 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00315.
- [29] F. R. Balkwill, M. Capasso, and T. Hagemann, “The tumor microenvironment at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. 23, pp. 5591–5596, 2012, doi: 10.1242/jcs.116392.
- [30] H. Tang, J. Qiao, and Y. X. Fu, “Immunotherapy and tumor microenvironment,” *Cancer Lett.*, vol. 370, no. 1, pp. 85–90, 2016, doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.009.
- [31] T. Karpanen and J. Olweus, “The potential of donor T-cell repertoires in neoantigen-targeted cancer immunotherapy,” *Front. Immunol.*, vol. 8, no. DEC, pp. 1–8, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01718.
- [32] D. S. Vinay *et al.*, “Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 35, pp. S185–S198, 2015, doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004.
- [33] M. G. Vander, “Understanding the Warburg Effect :,” vol. 1029, no. 2009, 2012, doi: 10.1126/science.1160809.
- [34] S. Agnihotri and G. Zadeh, “Metabolic reprogramming in glioblastoma: The influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions,” *Neuro. Oncol.*, vol. 18, no. 2, pp. 160–172, 2016, doi: 10.1093/neuonc/nov125.
- [35] X. X. Wang *et al.*, “TWIST1 transcriptionally regulates glycolytic genes to promote the Warburg metabolism in pancreatic cancer,” *Exp. Cell Res.*, vol. 386, no. 1, p. 111713, 2020, doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111713.
- [36] R. G. Hanselmann and C. Welter, “Origin of cancer: An information, energy, and matter disease,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 4, no. NOV, 2016, doi: 10.3389/fcell.2016.00121.
- [37] S. Aftab and A. R. Shakoori, “Low glucose availability alters the expression of genes involved in initial adhesion of human glioblastoma cancer cell line SF767,”

- J. Cell. Biochem.*, vol. 120, no. 10, pp. 16824–16839, 2019, doi: 10.1002/jcb.28940.
- [38] P. E. Porporato, S. Dhup, R. K. Dadhich, T. Copetti, and P. Sonveaux, “Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: A comprehensive review,” *Front. Pharmacol.*, vol. AUG, no. August, pp. 1–18, 2011, doi: 10.3389/fphar.2011.00049.
- [39] M. Manerba, L. Di, M. Govoni, M. Roberti, M. Recanatini, and G. Di, “LDH inhibition impacts on heat shock response and induces senescence of hepatocellular carcinoma cells,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 105, no. May, pp. 91–98, 2017, doi: 10.1016/j.ejps.2017.05.015.
- [40] K. Duan *et al.*, “Lactic acid induces lactate transport and glycolysis/OXPHOS interconversion in glioblastoma,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 503, no. 2, pp. 888–894, 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.092.
- [41] G. A. Brooks, “The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory,” *Cell Metab.*, vol. 27, no. 4, pp. 757–785, 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.008.
- [42] S. Jawhari, M. H. Ratinaud, and M. Verdier, “Glioblastoma, hypoxia and autophagy: A survival-prone ‘ménage-à-trois,’” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 10, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.318.
- [43] Y. Feng and B. Godwin, “Glioma Epithelial-mesenchymal Transition and its Influencing Factors,” vol. 28, no. 6, pp. 1598–1604, 2019.
- [44] J. M. Przystal *et al.*, “Efficacy of arginine depletion by ADI-PEG20 in an intracranial model of GBM,” *Cell Death Dis.*, vol. 9, no. 12, 2018, doi: 10.1038/s41419-018-1195-4.
- [45] Q. T. Ostrom *et al.*, “Neuro-Oncology CBTRUS Statistical Report : Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the,” vol. 21, pp. 1–100, 2019, doi: 10.1093/neuonc/noz150.
- [46] M. E. Davis, “Glioblastoma: Overview of disease and treatment,” *Clin. J. Oncol. Nurs.*, vol. 20, no. 5, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1188/16.CJON.S1.2-8.
- [47] A. O. Sasmita, Y. P. Wong, and A. P. K. Ling, “Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme,” *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.*, vol. 14, no. 1, pp. 40–51, 2018, doi: 10.1111/ajco.12756.
- [48] H. I. Robins, S. Chang, N. Butowski, and M. Mehta, “Therapeutic advances for glioblastoma multiforme: Current status and future prospects,” *Curr. Oncol. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 66–70, 2007, doi: 10.1007/BF02951428.
- [49] J. Balça-Silva, D. Matias, A. do Carmo, A. B. Sarmiento-Ribeiro, M. C. Lopes, and V. Moura-Neto, “Cellular and molecular mechanisms of glioblastoma malignancy: Implications in resistance and therapeutic strategies,” *Semin.*

- Cancer Biol.*, vol. 58, no. June 2018, pp. 130–141, 2019, doi: 10.1016/j.semcancer.2018.09.007.
- [50] C. T. Stackhouse, J. R. Rowland, R. S. Shevin, R. Singh, G. Y. Gillespie, and C. D. Willey, “A Novel Assay for Profiling GBM Cancer Model Heterogeneity and Drug Screening,” pp. 1–15, 2019.
- [51] L. Liu, M. Li, Y. Xing, X. Wang, and Y. Wang, “The oncogenic roles of 27-hydroxycholesterol in glioblastoma,” *Oncol. Lett.*, pp. 3623–3629, 2019, doi: 10.3892/ol.2019.10690.
- [52] C. Ali and D. T. Trafalis, “Glioblastoma multiforme : Pathogenesis and treatment,” vol. 152, pp. 63–82, 2015, doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.005.
- [53] C. Amidei and D. S. Kushner, “Clinical implications of motor deficits related to brain tumors,” *Neuro-Oncology Pract.*, vol. 2, no. 4, pp. 179–184, 2015, doi: 10.1093/nop/npv017.
- [54] M. IJzerman-Korevaar, T. J. Snijders, A. de Graeff, S. C. C. M. Teunissen, and F. Y. F. de Vos, “Prevalence of symptoms in glioma patients throughout the disease trajectory: a systematic review,” *J. Neurooncol.*, vol. 140, no. 3, pp. 485–496, 2018, doi: 10.1007/s11060-018-03015-9.
- [55] P. M. Woo *et al.*, “A multifaceted review of temozolomide resistance mechanisms in glioblastoma beyond O-6-methylguanine-DNA methyltransferase,” *Glioma*, vol. 2, no. 2, p. 68, 2019, doi: 10.4103/glioma.glioma\_3\_19.
- [56] L. Miron, “Cytotoxic chemotherapy – principles and indications in cancer,” *Oncolog-Hematolog.ro*, vol. 3, no. 1, pp. 26–33, 2018, doi: 10.26416/onhe.44.3.2018.2024.
- [57] T. Kanzawa, I. M. Germano, T. Komata, H. Ito, Y. Kondo, and S. Kondo, “Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells,” *Cell Death Differ.*, vol. 11, no. 4, pp. 448–457, 2004, doi: 10.1038/sj.cdd.4401359.
- [58] A. Belter, J. Barciszewski, and A. M. Barciszewska, “Revealing the epigenetic effect of temozolomide on glioblastoma cell lines in therapeutic conditions,” *PLoS One*, vol. 15, no. 2, pp. 6–8, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0229534.
- [59] S. Pathania, R. Bhatia, A. Baldi, R. Singh, and R. K. Rawal, “Drug metabolizing enzymes and their inhibitors’ role in cancer resistance,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 105, no. March, pp. 53–65, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.117.
- [60] E. K. Noch, R. Ramakrishna, and R. Magge, “Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance,” *World Neurosurg.*, vol. 116, pp. 505–517, 2018, doi: 10.1016/j.wneu.2018.04.022.
- [61] M. D. Sweeney, S. Ayyadurai, and B. V. Zlokovic, “Pericytes of the neurovascular

- unit: Key functions and signaling pathways,” *Nat. Neurosci.*, vol. 19, no. 6, pp. 771–783, 2016, doi: 10.1038/nn.4288.
- [62] W. P. Mason, “Blood-brain barrier-associated efflux transporters: A significant but underappreciated obstacle to drug development in glioblastoma,” *Neuro. Oncol.*, vol. 17, no. 9, pp. 1181–1182, 2015, doi: 10.1093/neuonc/nov122.
- [63] M. Osswald *et al.*, “Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network,” *Nature*, vol. 528, no. 7580, pp. 93–98, 2015, doi: 10.1038/nature16071.
- [64] A. Bradshaw *et al.*, “Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme,” *Front. Surg.*, vol. 3, pp. 1203–1217, 2016, doi: 10.3389/fsurg.2016.00048.
- [65] C. Box, S. J. Rogers, M. Mendiola, and S. A. Eccles, “Tumour-microenvironmental interactions: Paths to progression and targets for treatment,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 20, no. 3, pp. 128–138, 2010, doi: 10.1016/j.semcancer.2010.06.004.
- [66] X. Y. Zhao S1, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, “Glioma-Derived Mutations in IDH1 Dominantly Inhibit IDH1 Catalytic Activity and Induce HIF-1 $\alpha$ ,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2011, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839.
- [67] R. J. Deberardinis *et al.*, “Beyond aerobic glycolysis : Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis,” 2007.
- [68] J. Guo *et al.*, “Dimethylaminomicheliolide (DMAMCL) Suppresses the Proliferation of Glioblastoma Cells via Targeting Pyruvate Kinase 2 (PKM2) and Rewiring Aerobic Glycolysis,” *Front. Oncol.*, vol. 9, no. October, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00993.
- [69] M. V. Liberti and J. W. Locasale, “The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 41, no. 3, pp. 211–218, 2016, doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- [70] Z. Chen, H. Zhao, N. Fu, and L. Chen, “The diversified function and potential therapy of ectopic olfactory receptors in non-olfactory tissues,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 3, pp. 2104–2115, 2018, doi: 10.1002/jcp.25929.
- [71] S. DeMaria and J. Ngai, “The cell biology of smell,” *J. Cell Biol.*, vol. 191, no. 3, pp. 443–452, 2010, doi: 10.1083/jcb.201008163.
- [72] U. B. Kaupp, “Olfactory signalling in vertebrates and insects: Differences and commonalities,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 11, no. 3, pp. 188–200, 2010, doi: 10.1038/nrn2789.
- [73] C. R. A. Santos, A. C. Duarte, A. R. Costa, J. Tomás, T. Quintela, and I.

- Gonçalves, “The senses of the choroid plexus,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 182, no. July, p. 101680, 2019, doi: 10.1016/j.pneurobio.2019.101680.
- [74] L. Gelis *et al.*, “Functional characterization of the odorant receptor 51E2 in human melanocytes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 34, pp. 17772–17786, 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.734517.
- [75] R. T. Dorsam and J. S. Gutkind, “G-protein-coupled receptors and cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 2, pp. 79–94, 2007, doi: 10.1038/nrc2069.
- [76] L. Gelis, N. Jovancevic, F. G. Bechara, E. M. Neuhaus, and H. Hatt, “Functional expression of olfactory receptors in human primary melanoma and melanoma metastasis,” *Exp. Dermatol.*, vol. 26, no. 7, pp. 569–576, 2017, doi: 10.1111/exd.13316.
- [77] E. M. Neuhaus, W. Zhang, L. Gelis, Y. Deng, J. Noldus, and H. Hatt, “Activation of an olfactory receptor inhibits proliferation of prostate cancer cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 24, pp. 16218–16225, 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.012096.
- [78] G. Sanz *et al.*, “Promotion of cancer cell invasiveness and metastasis emergence caused by olfactory receptor stimulation,” *PLoS One*, vol. 9, no. 1, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0085110.
- [79] G. Sanz *et al.*, “Structurally related odorant ligands of the olfactory receptor OR51E2 differentially promote metastasis emergence and tumor growth,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 3, pp. 4330–4341, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.13836.
- [80] N. Jovancevic *et al.*, “Odorant receptor 51E2 agonist  $\beta$ -ionone regulates RPE cell migration and proliferation,” *Front. Physiol.*, vol. 8, no. NOV, pp. 1–14, 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00888.
- [81] W. H. Aisenberg *et al.*, “Defining an olfactory receptor function in airway smooth muscle cells,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. May, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1038/srep38231.
- [82] A. J. Chang *et al.*, “Oxygen control of breathing by an olfactory receptor activated by lactate,” vol. 527, no. 7577, pp. 240–244, 2016, doi: 10.1038/nature15721.Oxygen.
- [83] F. Nakano, K. Sakushima, R. Umeki, I. Yabe, A. Endoh, and H. Sasaki, “Effects of age and glucose levels on lactate levels in cerebrospinal fluid examination of neurodegenerative diseases,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 378, pp. 45–48, 2017, doi: 10.1016/j.jns.2017.04.033.
- [84] J. Litak, M. Mazurek, C. Grochowski, P. Kamieniak, and J. Roliński, “PD-L1/PD-1 axis in glioblastoma multiforme,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 21, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3390/ijms20215347.
- [85] S. Oudard *et al.*, “High glycolysis in gliomas despite low hexokinase transcription and activity correlated to chromosome 10 loss,” *Br. J. Cancer*, vol. 74, no. 6, pp.

- 839–845, 1996, doi: 10.1038/bjc.1996.446.
- [86] M. Yamagata, K. Hasuda, T. Stamato, and I. F. Tannock, “The contribution of lactic acid to acidification of tumours: Studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase,” *Br. J. Cancer*, vol. 77, no. 11, pp. 1726–1731, 1998, doi: 10.1038/bjc.1998.289.
- [87] C. B. Colen *et al.*, “Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: An in vivo study<sup>1</sup>,” *Neoplasia*, vol. 13, no. 7, pp. 620–632, 2011, doi: 10.1593/neo.11134.
- [88] C. Flegel, S. Manteniotis, S. Osthold, H. Hatt, and G. Gisselmann, “Expression Profile of Ectopic Olfactory Receptors Determined by Deep Sequencing,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0055368.
- [89] S. K. Chatterjee, C. Malick, S. Bhattacharya, V. R. Suresh, R. Kundu, and S. K. Saikia, “Ectopic expression of olfactory receptors and associated G-protein subunits in the head integument of the amphihaline migratory fish hilsa *Tenualosa ilisha*,” *J. Fish Biol.*, vol. 95, no. 1, pp. 324–334, 2019, doi: 10.1111/jfb.13801.
- [90] C. Xia, W. Ma, F. Wang, S. B. Hua, and M. Liu, “Identification of a prostate-specific G-protein coupled receptor in prostate cancer,” *Oncogene*, vol. 20, no. 41, pp. 5903–5907, 2001, doi: 10.1038/sj.onc.1204803.
- [91] M. Rigau *et al.*, “PSGR and PCA3 as biomarkers for the detection of prostate cancer in urine,” *Prostate*, vol. 70, no. 16, pp. 1760–1767, 2010, doi: 10.1002/pros.21211.
- [92] D. Maßberg *et al.*, “The activation of OR51E1 causes growth suppression of human prostate cancer cells,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 30, pp. 48231–48249, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.10197.
- [93] T. P. Brown and V. Ganapathy, “Lactate/GPR81 signaling and proton motive force in cancer: Role in angiogenesis, immune escape, nutrition, and Warburg phenomenon,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 206, p. 107451, 2020, doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107451.
- [94] S. Sun, H. Li, J. Chen, and Q. Qian, “Lactic acid: No longer an inert and end-product of glycolysis,” *Physiology*, vol. 32, no. 6, pp. 453–463, 2017, doi: 10.1152/physiol.00016.2017.
- [95] R. Pérez-Tomás and I. Pérez-Guillén, “Lactate in the tumor microenvironment: An essential molecule in cancer progression and treatment,” *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 11, pp. 1–29, 2020, doi: 10.3390/cancers12113244.
- [96] K. Fischer *et al.*, “Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells,” *Blood*, vol. 109, no. 9, pp. 3812–3819, 2007, doi: 10.1182/blood-2006-07-

035972.

- [97] S. W. Hong, Y. Jiang, S. Kim, C. J. Li, and D. K. Lee, “Target gene abundance contributes to the efficiency of siRNA-mediated gene silencing,” *Nucleic Acid Ther.*, vol. 24, no. 3, pp. 192–198, 2014, doi: 10.1089/nat.2013.0466.