

Avaliação da expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da adenosina em linhas celulares de glioblastoma e em astrócitos

Ana Cláudia Batista Honório

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Biomédicas

2º ciclo de estudos

Orientador: Prof. Doutor José Francisco Cascalheira

Co-orientadora: Prof. Doutora Helena Tomás Marcelino Lopes

junho de 2020

Dedicatória

Ao meu avô Malagueta.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Professor José Francisco Cascalheira, pela integração no seu projeto, pela transmissão dos seus conhecimentos, disponibilidade, apoio científico e voto de confiança.

O projeto PTDC/BIMONC/7121/2014 liderado pelo Professor José Francisco Cascalheira.

À minha co-orientadora, Professora Helena Marcelino, pela disponibilidade constante, conselhos, ajuda e conhecimentos práticos e teóricos fundamentais para a elaboração desta dissertação.

À minha colega, Carolina Rosa, pelos bons momentos passados no laboratório e pela sua ajuda e companheirismo.

À melhor amiga que podia imaginar, Cristiana, pelo seu apoio, por arranjar sempre alguma forma de me ajudar, encorajar e principalmente, por estar sempre comigo nos bons e nos maus momentos, qualquer que fosse a distância que nos separasse.

Ao meu namorado, por toda a paciência, apoio e amor incondicional, por mais difíceis que sejam os meus dias.

À minha família, por tudo o que sempre fizeram por mim.

Ao meu irmão, por estar sempre do meu lado e tornar a minha vida mais completa desde 2003.

Por fim, e mais importante, agradeço do fundo do coração aos meus pais, pelo apoio, por nunca me deixarem desistir de nada, pela paciência, pela força e pelo amor incondicional. Nada seria possível sem vocês. Obrigada por acreditarem sempre em mim e fazerem de mim a pessoa que sou hoje.

Lista de Publicações

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

Lista de Comunicações Científicas

Apresentações em Congressos

Apresentações orais

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

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

Resumo

O glioblastoma é um tumor de grau IV do sistema nervoso central e é caracterizado pelo seu crescimento infiltrativo. A falta de oxigenação, também conhecida por hipóxia, promove a invasão tumoral nos tecidos saudáveis do cérebro, como forma de mecanismo de escape a este ambiente adverso. Nestas condições, há um aumento na concentração de nucleótidos e nucleósidos extracelulares, particularmente a adenosina (Ado), sendo este considerado um mecanismo de proteção endógeno durante a hipóxia. A concentração extracelular basal de Ado encontra-se normalmente entre 30 – 200 nM, no entanto esta pode aumentar por dois mecanismos: hidrólise enzimática do ATP extracelular a AMP e posterior hidrólise deste a Ado através da ação da ecto-5'-nucleotidase (NT5E), ou efluxo da Ado pelos transportadores de nucleósidos bidirecionais (ENTs) após a sua produção intracelular. Intracelularmente, a Ado pode ser formada a partir do AMP através da acção da 5'-ectonucleotidase, ou hidrólise da S-adenosil-L-homocisteína catalisada pela S-adenosil-homocisteinase (AHCY). A adenosina pode ser consumida intracelularmente por fosforilação a AMP catalisada pela cinase da adenosina (ADK), no entanto, também pode ocorrer a hidrólise a inosina através da desaminase da adenosina (ADA). As concentrações intra- e extracelulares da Ado são mantidas em equilíbrio pelos ENTs – ENT1 e ENT2, que transportam este metabolito de acordo com o gradiente de concentração. Resultados anteriores indicam que a produção de adenosina está aumentada no glioblastoma (GBM), onde pode desempenhar um papel na progressão do tumor. O principal objetivo deste trabalho é avaliar a expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da Ado, quer em situação de concentrações de adenosina basais quer aumentadas, em linhas celulares de glioblastoma e compará-la com a expressão observada em astrócitos humanos (HA). O efeito do aumento da concentração de adenosina na proliferação/viabilidade celular será também avaliado. Foram testadas 3 linhas de GBM: U87, SNB19 e U373. A expressão enzimática foi analisada por qPCR e a viabilidade/proliferação celular foi avaliada pelo método do MTT.

Os resultados obtidos mostram que a Ado (30 μ M) adicionada exogenamente diminui a proliferação/viabilidade celular em astrócitos apenas quando os recetores da adenosina são bloqueados pela presença de um *cocktail* de antagonistas (CA), enquanto o aumento da concentração de adenosina por inibição do seu consumo utilizando um inibidor da ADK, o ABT-702 (30 μ M), diminui a viabilidade/proliferação celular tanto nos astrócitos como nas linhas celulares de GBM, quer na presença quer na ausência de CA, sugerindo um efeito não mediado por recetor.

Relativamente à expressão do mRNA, comparativamente a HA, a expressão de ADK está aumentada nas linhas U373 e SNB19 enquanto a ADA está aumentada apenas na linha SNB19. Relativamente à expressão dos ENTs, o ENT1 está aumentado em células U373 e U87 enquanto o aumento da expressão do ENT2 foi observado apenas em U373, comparativamente a HA. Observou-se ainda uma diminuição da expressão de NT5E em U373 e SNB19 e um aumento em U87, relativamente a HA. Não foi observada diferenças de expressão da AHCY em qualquer das linhas comparativamente a HA.

Comparativamente com o controle, o aumento da concentração de adenosina produziu uma diminuição na expressão da ENT2, nas linhas celulares U373 e U87, e na ENT1, nas células U373. Em HA e em células U373 a expressão de NT5E foi aumentada, enquanto nas células U87 foi reduzida pelos níveis elevados de adenosina. Um aumento da concentração de adenosina produziu aumento da expressão de AHCY em HA. Não foi observada modificação na expressão de nenhum dos genes analisados na linha celular SNB19 por aumento da concentração de adenosina.

Em conclusão, observam-se diferenças significativas entre os astrócitos e as linhas celulares de glioblastoma, quer nos níveis de expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da adenosina quer na resposta dessa expressão face ao aumento da concentração de adenosina.

Palavras-chave

Glioblastoma, adenosina, metabolismo, enzimas.

Abstract

Glioblastoma is a grade IV type tumor of the central nervous system and is characterized by its infiltrative growth. The lack of oxygenation, also known as hypoxia, promotes the tumor cell invasiveness in the healthy tissues of the brain as an escape mechanism to this adverse environment. Under these conditions, there is an extracellular nucleotides and nucleosides increase in concentration, particularly adenosine (Ado), which is considered an endogenous protection mechanism during hypoxia. Ado basal concentration is usually between 30 – 200 nM, however it can be increased by two mechanisms: extracellular ATP enzymatic hydrolysis into AMP followed by its hydrolysis to Ado by ecto-5'-nucleotidase (NT5E), or Ado export by equilibrative nucleoside transporters (ENTs) after its intracellular production. Intracellularly, Ado can be formed from AMP hydrolysis catalyzed by 5'-ectonucleotidase, or from S-adenosylhomocysteine hydrolysis by catalyzed by the S-adenosylhomocysteinase (AHCY) enzyme. Adenosine can be consumed intracellularly by phosphorylation into AMP catalysed by adenosine kinase (ADK), however it may also be hydrolyzed into inosine by adenosine deaminase (ADA). Intracellular and extracellular Ado concentrations are maintained in equilibrium by ENTs – ENT1 and ENT2, which carry this metabolite according to the concentration gradient. Previous reports indicate that adenosine production is increased in glioblastoma where it might play a role on tumor progression. The main goal of this work is to evaluate enzymes expression involved in Ado metabolism, either under basal and increased adenosine concentrations, in human glioblastoma cell lines and compare it with the expression observed in human astrocytes (HA). The effect of increasing adenosine concentration on cell proliferation/viability will also be assessed. Three lines of GBM were tested: U87, SNB19 and U373. Enzymatic expression was analyzed by qPCR and cell viability/proliferation was evaluated by the MTT method.

The results obtained suggest that Ado (30 μ M) added exogenously decreases cell proliferation/viability in astrocytes only when adenosine receptors are blocked by the presence of a cocktail of antagonists (CA), while increasing the concentration of adenosine by inhibiting their consumption using an ADK inhibitor, ABT-702 (30 μ M), decreases cell viability/proliferation in both astrocytes and GBM cell lines, either in the presence or in the absence of CA, suggesting a non-receptor mediated effect.

Regarding mRNA gene expression, compared to HA, ADK expression is increased in the U373 and SNB19 cell lines while ADA is increased only in the SNB19 line. Considering the expression of ENTs, ENT1 is increased in U373 and U87 cells while increased expression

of ENT2 was observed only in U373, compared to HA. There was also a decrease in NT5E expression in U373 and SNB19 and an increase in U87, relative to HA. There were no differences in expression of AHCY in any of the lines compared to HA.

Compared to the control, the increase in adenosine concentration produced a decrease in the expression of ENT2, in the U373 and U87 cell lines, and in ENT1, in the U373 cells. In HA and U373 cells, NT5E expression was increased, while in U87 cells it was reduced by increased levels of adenosine. An increase in the concentration of adenosine produced an increase in AHCY expression in HA. There was no change in the expression of any of the genes analyzed in the SNB19 cell line by increasing the concentration of adenosine.

In conclusion, there are significant differences between astrocytes and glioblastoma cell lines, both in the levels of expression of the enzymes involved in the metabolism of adenosine and in the response of that expression to the increase in the concentration of adenosine.

Keywords

Glioblastoma, adenosine, metabolism, enzymes.

Índice

I.	Introdução.....	1
1.	Componentes Celulares do Sistema Nervoso.....	2
1.1.	Astrócitos	2
2.	Gliomas	3
2.1.	Glioblastoma Multiforme (GBM)	4
2.2.	Linhas celulares humanas de glioblastoma	7
2.2.1.	U373	7
2.2.2.	SNB19	8
2.2.3.	U87	9
3.	Adenosina (Ado).....	10
3.1.	Origem e metabolismo da Adenosina	10
3.2.	Funções celulares da adenosina.....	13
3.3.	Recetores da adenosina	14
3.4.	Enzimas envolvidas no metabolismo da adenosina	15
3.4.1.	Ecto-5'-nucleotidase (NT5E)	15
3.4.2.	Adenosina Desaminase (ADA).....	16
3.4.3.	Cinase da Adenosina (ADK).....	16
3.4.4.	Hidrolase da S-adenosil-homocisteína (AHCY)	16
3.4.5.	Transportadores de Adenosina	17
I.	Objetivo	16
II.	Materiais e métodos	21
1.	Materiais e reagentes	22
2.	Células primárias e linhas celulares de glioblastoma	22
2.1.	Condições de cultura.....	22
2.2.	Estímulos	23
2.3.	Ensaio de MTT.....	26
2.4.	Recolha de células.....	26

3.	RNA total.....	27
3.1.	Extração de RNA total	27
3.2.	Quantificação do RNA total	27
3.3.	Determinação da integridade do RNA.....	27
4.	Transcrição Reversa	28
4.1.	Tratamento com DNase	28
4.2.	Síntese de DNA complementar (cDNA)	28
5.	PCR.....	29
5.1.	Desenho de <i>primers</i>	29
5.2.	PCR convencional	30
6.	PCR em Tempo Real	30
6.1.	Curvas de eficiência	30
6.2.	Determinação da expressão génica.....	31
7.	Análise de dados e estatística.....	31
IV.	Resultados.....	33
1.	Efeito do aumento da concentração de Ado na viabilidade/proliferação celular em HA e linhas de GBM.....	34
1.1.	Efeito da Ado exógena na viabilidade/proliferação celular	34
1.2.	Efeito do ABT-702 na viabilidade/proliferação celular.....	39
2.	Expressão dos genes do metabolismo da adenosina nas linhas celulares de glioblastoma e nos astrócitos humanos	42
2.1.	Otimização de <i>primers</i>	42
2.2.	PCR em Tempo Real	44
2.2.1.	Expressão génica	44
V.	Discussão.....	55
VI.	Conclusão e Perspetivas futuras	61
VII.	Referências Bibliográficas	64

Lista de Figuras

Figura 1. Astrócitos normais humanos, marcados com GFAP.

Figura 2. Massa tumoral do glioblastoma e as suas características patológicas.

Figura 3. Morfologia da linha celular U373, ampliação 40x.

Figura 4. Morfologia da linha celular de glioblastoma, SNB19, semeada em DMEM, com 10% de soro.

Figura 5. Morfologia da linha celular U87.

Figura 6. Estrutura da adenosina.

Figura 7. Metabolismo da adenosina.

Figura 8. Adenosina e as suas funções promotoras tumorais e imunossupressoras.

Figura 9. O equilíbrio entre o ATP extracelular e a Ado regulam as respostas imunitárias

Figura 10. Uptake da adenosina através dos transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENTs) através de um gradiente de concentração.

Figura 11. Disposição das placas de 96 poços, estimuladas com Ado 30 μ M ou ABT-702 30 μ M, cocktail de antagonistas (CA), CA + Ado ou CA + ABT-702.

Figura 12. Disposição das placas de 6 poços, estimuladas com Ado 30 μ M (condição 2), ABT-702 15 μ M (condição 3), cocktail de antagonistas (CA) (condição 4), CA + Ado 30 μ M (condição 5) e CA + ABT-702 15 μ M (condição 6).

Figura 13. Percentagem de viabilidade celular de HA nas condições de controlo, Ado 30 μ M, CA e CA + Ado.

Figura 14. Percentagem de viabilidade celular de U373 nas condições de controlo, Ado 30 μ M, CA e CA + Ado.

Figura 15. Percentagem de viabilidade celular de U87 nas condições de controlo, Ado 30 μ M, CA e CA + Ado.

Figura 16. Percentagem de viabilidade celular de SNB19 nas condições de controlo, Ado 30 μ M, CA e CA + Ado.

Figura 17. Percentagem de viabilidade celular de HA nas condições de controlo, ABT-702 30 μ M, CA e CA + ABT-702.

Figura 18. Percentagem de viabilidade celular de U373 nas condições de controlo, ABT-702 30 μ M, CA e CA + ABT-702.

Figura 19. Percentagem de viabilidade celular de U87 nas condições de controlo, ABT-702 30 μ M, CA e CA + ABT-702.

Figura 20. Percentagem de viabilidade celular de SNB19 nas condições de controlo, ABT-702 30 μ M, CA e CA + ABT-702.

Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com *GreenSafe* dos produtos de PCR amplificados, relativos aos genes envolvidos na via metabólica da adenosina.

Figura 22. Níveis de expressão do gene NT5E em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19).

Figura 23. Níveis de expressão do gene ENT1 em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19).

Figura 24. Níveis de expressão do gene ENT2 em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19).

Figura 25. Níveis de expressão do gene AHCY em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19).

Figura 26. Níveis de expressão do gene ADK em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19).

Figura 27. Níveis de expressão do gene ADA em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19).

Figura 28. Níveis de expressão do gene NT5E em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M.

Figura 29. Níveis de expressão do gene ENT1 em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M.

Figura 30. Níveis de expressão do gene ENT2 em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M.

Figura 31. Níveis de expressão do gene AHCY em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19).

Figura 32. Níveis de expressão do gene ADK em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M.

Figura 33. Níveis de expressão do gene ADA em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M.

Figura 34. Níveis de expressão dos genes NT5E, ENT1 e ENT2 na linha celular de glioblastoma U373, nas condições de Cocktail de Antagonistas (CA), CA + Ado e CA + ABT-702.

Figura 35. Níveis de expressão dos genes NT5E, ENT2 e ADA na linha celular de glioblastoma U87, nas condições de Cocktail de Antagonistas (CA), CA + Ado e CA + ABT-702.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados e tamanho do produto de PCR respectivo.

Lista de Esquemas

Esquema 1. *Timeline* da realização experimental relativa ao ensaio de viabilidade celular (MTT).

Esquema 2. *Timeline* da realização experimental relativa à recolha de células para posterior extração de RNA.

Lista de Abreviaturas

5'-NT	5'-Nucleotidase
Ado	Adenosina
ADA	Desaminase da adenosina
ADK	Adenosina cinase
ADP	Difosfato de adenosina
AGS	" <i>Astrocyte Growth Supplement</i> " (Suplemento de Crescimento para Astrócitos)
AHCY	Hidrolase da S-adenosil-L-homocisteína
APCP	5'-(α,β -methileno) difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPc	AMP cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
BBB	" <i>Blood Brain Barrier</i> " (Barreira Hemato-Encefálica)
CA	<i>Cocktail</i> de Antagonistas
cDNA	DNA complementar
CPC	" <i>Cancer Progenitor Cells</i> " (Células Progenitoras do Cancro)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	" <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> "
DMS	Diferença Média Significativa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	" <i>Desoxirribonucleic Acid</i> " (Ácido Desoxirribonucleico)
DPBS	" <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> "
ENT	" <i>Equilibrative Nucleoside Transporter</i> " (Transportador de Nucleósidos Equilibrativo)

EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EPM	Erro Padrão da Média
FBS	“ <i>Fetal Bovine Serum</i> ” (Soro Bovino Fetal)
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFAP	“ <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> ” (Proteína Glial Fibrilar Acídica)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GS	Sintase da glutamina
HA	“ <i>Human Astrocytes</i> ” (Astrócitos Humanos)
IDH	Desidrogenase do Isocitrato
mRNA	RNA mensageiro
MT	Metiltransferases
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCBI	“ <i>National Center for Biotechnology Information</i> ” (Centro Nacional para a Informação Biotecnológica)
OMS	Organização Mundial de Saúde (WHO, em inglês)
PA	“ <i>Plasminogen Activator</i> ” (Ativador do Plasminogénio)
P/S	“ <i>Penicillin/Streptomycin</i> ” (Penicilina/Estreptomicina)
PCR	“ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ” (Reação em Cadeia da Polimerase)
RNA	“ <i>Ribonucleic Acid</i> ” (Ácido Ribonucleico)
rRNA	RNA ribossomal
SAH	S-adenosil-L-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SNC	Sistema Nervoso Central
SVZ	“ <i>Subventricular zone</i> ” (Zona Subventricular)

I. Introdução

1. Componentes Celulares do Sistema Nervoso

O sistema nervoso é composto por dois tipos celulares: os neurónios e a glia. Os neurónios são caracterizados por possuírem processos dendríticos e axónio, responsáveis por transmitir sinais elétricos rápidos na forma de potenciais de ação – designados por sinapses.¹ Todas as outras células que não possuam esta característica fazem parte da glia.² Da glia fazem parte os astrócitos, a microglia, os oligodendrócitos e os endotélio. As células imunitárias inatas do sistema nervoso central (SNC)³, designadas por microglia, são responsáveis por inspecionar o cérebro à procura de danos eliminando células mortas e sinapses em excesso.⁴ Os oligodendrócitos são responsáveis por formar e manter as bainhas de mielina dos axónios.⁵ Por fim, os endotélio revestem os ventrículos do cérebro e a medula espinhal, e atuam como uma barreira física entre o líquido cefalorraquidiano ventricular e o parênquima cerebral.⁶

1.1. Astrócitos

Os astrócitos fazem parte de uma classe de células designada por neuroglia que suportam o SNC. Representam uma diversa população de células com várias funções como sintetizar proteínas da matriz extracelular, moléculas de adesão e fatores tróficos que regulam a maturação neuronal e a formação de sinapses. Fazem também parte da BBB, regulam a concentração iónica extracelular, mantendo um ambiente químico adequado à sinalização neuronal e controlam a concentração de neurotransmissores no cérebro⁷.

São originários de três zonas diferentes: a glia radial que se encontra na zona ventricular (VZ) embrionária, progenitores da zona subventricular (SVZ) pós-natal e uma terceira linhagem possivelmente originária de precursores restritos à glia. Estas três linhagens de astrócitos diferentes sugerem que estas células não têm a mesma origem, o que explica a diversidade de astrócitos existentes na mesma zona do cérebro⁸.

Estas células têm uma morfologia muito complexa e heterogénea. Estão distribuídos por todo o sistema nervoso e não possuem axónios nem dendrites. Dividem-se em duas subpopulações: fibrosos – encontrados na substância branca do cérebro, possuem prolongamentos longos, finos e sem ramificações e as suas extremidades envolvem os nódulos de Ranvier; e protoplasmáticos – encontrados na substância cinzenta do cérebro e

possuem muitos prolongamentos ramificados que envolvem sinapses e as suas extremidades envolvem os vasos sanguíneos⁷.

Os astrócitos são identificados pela presença de filamentos intermediários (fibrilhas gliais) cujo componente maioritário desses filamentos se designa por GFAP, específico para os astrócitos. Expressam também diversos recetores, nomeadamente recetores acoplados à proteína G, recetores ionotrópicos, recetores para fatores de crescimento, quimiocinas, esteróides e recetores envolvidos na imunidade inata (ex. recetores *Toll-like*)⁷.

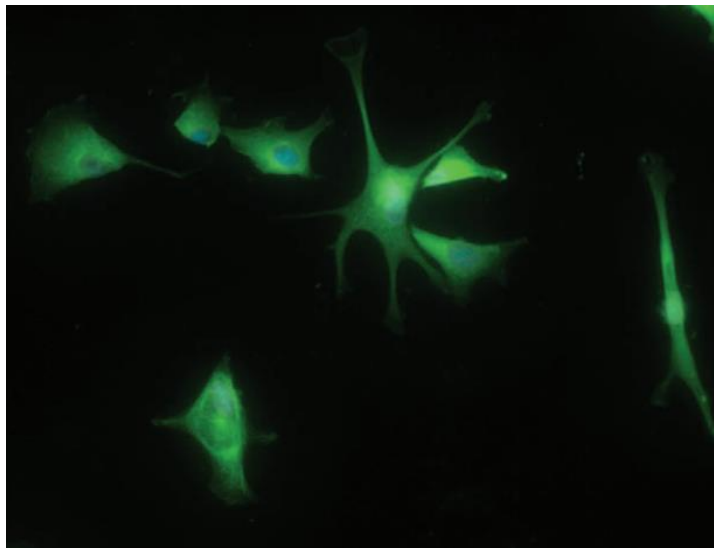


Figura 1. Astrócitos normais humanos, marcados com GFAP. Adaptada de (Jones et al, 2017)

2. Gliomas

O cancro é uma doença somática, sendo por vezes hereditária, na qual a expressão génica aberrante faz com que as células saudáveis ignorem sinais controladores do crescimento e formem um tumor.⁹

Os gliomas são um tipo de tumor do sistema nervoso central (SNC), originários de células gliais (progenitoras) ou células estaminais que desenvolvem características gliais depois da sua transformação neoplásica.¹⁰

Há dois tipos principais de gliomas, os gliomas difusos e os não difusos. Os gliomas difusos são os neoplasmas intrínsecos mais frequentes do SNC, principalmente em pacientes adultos e são caracterizados por terem um crescimento infiltrativo no parênquima do SNC adjacente¹⁰. Segundo uma análise histopatológica, estes podem ainda ser divididos em três subgrupos, os astrocitomas, onde se inserem os glioblastomas (os mais frequentes

e malignos), os oligodendrogliomas e os tumores com características astrocitária e oligodendroglial (oligoastrocitomas)¹¹. O crescimento do glioma difuso é acompanhado pela agregação de células neoplásicas ao redor de neurónios, vasos sanguíneos e debaixo da pia-máter¹⁰.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os diferentes subgrupos de tumores são ainda classificados tendo em conta os seguintes graus:¹²

Grau I: Lesões com um baixo potencial proliferativo onde existe a possibilidade de cura após a resseção cirúrgica;

Grau II: Geralmente de natureza infiltrativa, com um nível de atividade proliferativo baixo, no entanto podem surgir novamente após a sua resseção. Alguns tipos de tumores deste grau tendem a progredir para graus de malignidade superiores;

Grau III: Lesões com evidências histológicas de malignidade. A maioria dos pacientes com tumores deste grau recebem quimioterapia ou radioterapia adjuvantes;

Grau IV: Tumores citologicamente malignos, com atividade mitótica e tendência a necrose. São tipicamente associados com uma evolução muito rápida da doença pré- e pós-operatória e geralmente levam à morte do paciente.

2.1. Glioblastoma Multiforme (GBM)

Os astrocitomas representam 40-50% de todos os neoplasmas primários do SNC e pelo menos 70% de todos os gliomas.¹³ A cada ano são diagnosticados cerca de 2 a 3 casos de astrocitomas de grau IV por 100 000 adultos na Europa e América do Norte¹⁴. Estes tumores são também conhecidos por glioblastoma multiforme (GBM) e, devido ao seu potencial proliferativo e invasivo elevado, a percentagem de pacientes com esta patologia que ultrapassa os 5 anos de sobrevivência é inferior a 5%.⁹

O GBM é caracterizado pelo seu crescimento infiltrativo, pelo que o tecido normal não é claramente distinguível da massa tumoral, além de ter uma vascularização muito elevada e, portanto, uma elevada angiogénese. Além disso, as células que constituem a massa tumoral libertam níveis elevados do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que leva à migração de novas células endoteliais para a massa tumoral, promovendo assim a angiogénese¹⁵. Esta vasculatura tumoral induz a proliferação e a autorrenovação de células tumorais cerebrais. Estas massas tumorais mostram também focos necróticos, devido à hipoxia, uma densidade celular muito elevada e estruturas anormais. Os GBM primários possuem áreas grandes de necrose na área central do tumor, que resulta do fornecimento

sanguíneo fraco e possuem também focos necróticos pequenos e irregulares rodeados de áreas pseudopaliçadas (como demonstrado na figura 2) - criadas por células tumorais que migram do centro hipóxico¹⁶. Para além disso, o GBM possui hiperplasia microvascular¹⁷.

As células que constituem o GBM são pequenas, caracterizadas por polimorfismo, anaplasia e anisocariose significativa¹⁸. As metástases neste tipo de tumor são raras pois a existência da barreira criada pelas meninges cerebrais, o rápido crescimento tumoral e também a rápida progressão desta doença não permitem a passagem das células cancerígenas para os restantes órgãos, pelo sangue e pelo fluido cerebrospinal¹⁹.

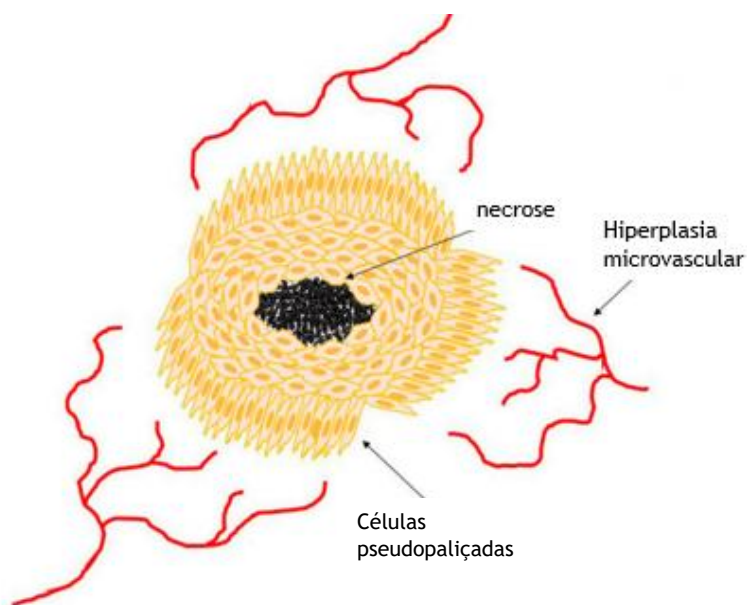


Figura 2. Massa tumoral do glioblastoma e as suas características patológicas. Adaptada de (Monteiro, et al. 2017)

Para as classificações dos tumores da glia, foram consideradas as mutações da desidrogenase do isocitrato 1 e 2 (IDH1 e IDH2) ²⁰, que resultam numa inibição de desmetilases de histonas, levando a alterações na metilação do DNA, podendo contribuir para a tumorigénese.²¹ Estas alterações genéticas são encontradas exclusivamente em astrocitomas e oligodendrogliomas infiltrativos^{22,23}. Dependendo da presença ou ausência destas mutações, os glioblastomas são divididos em dois grupos, o glioblastoma IDH-*wildtype* que corresponde a cerca de 90% dos casos diagnosticados (que correspondem maioritariamente a glioblastoma primário, ou seja, o tumor é formado a partir de células gliais normais através de uma oncogénese de vários passos) e o glioblastoma IDH-mutante,

correspondendo em geral a glioblastoma secundário, em que o tumor se origina de células cancerígenas de um grau mais baixo)²².

Num diagnóstico de glioma primário, verifica-se a presença no glioma de “*glial fibrillary acidic protein*” (GFAP) através de imunohistoquímica, pois o aumento da malignidade dos tumores secundários de origem astrocitária está associada com a perda da expressão da GFAP²⁴. No glioblastoma, a perda da expressão desta proteína indica células tumorais indiferenciadas, mas não se relaciona com a progressão nem com o desenvolvimento tumoral²⁴. Tal como mencionado anteriormente, o glioblastoma infiltra-se nos tecidos circundantes, por isso a sua ressecção completa nem sempre é possível e a radioterapia nem sempre é eficiente, pois as células tumorais encontradas nas zonas hipóxicas são resistentes a esta terapia, e além disso, a barreira hemato-encefálica (BBB) torna o tratamento mais difícil²⁵.

Existem várias razões que podem contribuir para o fenótipo recorrente do GBM e a sua resistência às terapias utilizadas. O cérebro é um órgão com um *turnover* celular baixo ou ausente, o que impede a aplicação de terapias ablativas²⁶. As massas tumorais do GBM podem invadir áreas funcionais do cérebro o que torna impossível aos cirurgiões remover completamente os tecidos patológicos, afetando deste modo, o destino do paciente⁹. A barreira hemato-encefálica protege o SNC, impedindo que muitos medicamentos usados na quimioterapia atinjam os locais afetados pelo tumor. Por esta razão, muitas das estratégias terapêuticas aplicadas noutros tipos de tumores não podem ser utilizadas no contexto de tumores cerebrais²⁶. O GBM possui uma variedade de anormalidades genéticas, tornando-se desta forma muito heterogéneo, daí ser um desafio a nível terapêutico, uma vez que células diferentes respondem de maneira diferente às terapias administradas⁹. Neste tipo de glioma foram identificadas células estaminais cancerígenas (CSC) designadas por células estaminais de glioma (GSC), que indicam serem responsáveis pela permanência e evolução destes tumores depois de uma ressecção cirúrgica total⁹. Também tem sido reportado que os cancros mais agressivos contêm um maior número de CSC, uma vez que apenas estas células são capazes de se auto-renovar e originar células progenitoras cancerígenas (CPC). Estas CPC têm uma maior proliferação e conseguem originar células cancerígenas diferenciadas⁹.

A falta de oxigenação, conhecida por hipóxia, promove a invasão das células tumorais nos tecidos saudáveis do cérebro como um mecanismo de escape destas células a este ambiente adverso. Em situação de hipóxia há um aumento da concentração de nucleótidos e nucleósidos extracelulares, predominantemente a adenosina (Ado), sendo este considerado um mecanismo de proteção endógeno durante a hipóxia²⁷.

2.2. Linhas celulares humanas de glioblastoma

As seguintes linhas celulares de glioblastoma, foram utilizadas no presente estudo.

2.2.1. U373

A linha celular U373 é caracterizada por ter uma morfologia mesenquimal e ter ambos os cromossomas 7 e 17 geralmente tetrassômicos. Expressam a proteína nestina, sendo esta uma molécula característica de células estaminais neuroepiteliais e também mostram uma expressão elevada de marcadores de superfície associados com células estaminais mesenquimais. São células originárias de indivíduo do sexo masculino, caucasiano e de 61 anos e mostram uma elevada resistência a temozolomida, um medicamento frequentemente utilizado na quimioterapia²⁸.

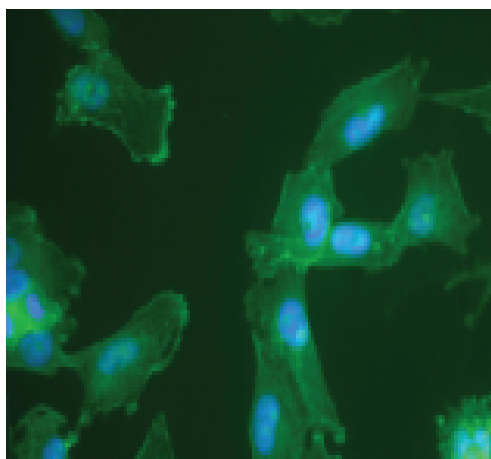


Figura 3. Morfologia da linha celular U373, ampliação 40x. Adaptada de (Etminan et al. 2011)

2.2.2. SNB19

A linha celular SNB19 deriva do glioblastoma e tem um ganho do cromossoma 7 e uma perda do cromossoma 10, possuem células tipicamente pequenas, relativamente uniformes e exibem poucos prolongamentos como os típicos dos astrócitos (como demonstrado na figura 4, no entanto quando são estimuladas com cAMP desenvolvem esses prolongamentos dendríticos²⁹.

Demonstram reatividade para um filamento intermediário encontrado nos astrócitos, o GFAP, confirmando, desta forma, a natureza glial das células. Além disso, produzem elevados níveis de uma protease designada *Plasminogen activator* (PA), que tem como função ativar a invasão tumoral, de uma forma direta por destruição de glicoproteínas e indiretamente pela estimulação do crescimento celular e ativação das citocinas. Também crescem em diferentes tipos de meio e não requerem um ambiente de CO₂²⁹.



Figura 4. Morfologia da linha celular de glioblastoma, SNB19, semeada em DMEM, com 10% de soro. Adaptada de (Welch et al. 1995)

2.2.3. U87

Esta é uma linha celular de glioblastoma, cujas células possuem uma morfologia epitelial e são originárias de um indivíduo do sexo masculino, caucasiano e de 44 anos. É uma linha heterogênea, pois contém dois tipos celulares: células aderentes e células esféricas pequenas que formam agregados.³⁰

Apresentam baixos níveis de mRNA de GFAP, no entanto são consideradas de origem glial pois é detectada imunoreatividade para a proteína S100 (proteína acídica de células gliais) em suspensões celulares e esferoides destas células. Sintetizam uma forma mutante da proteína supressora tumoral, PTEN, que permite a ativação de outras proteínas que possuem um papel na proliferação, angiogênese e resistência à apoptose.³⁰

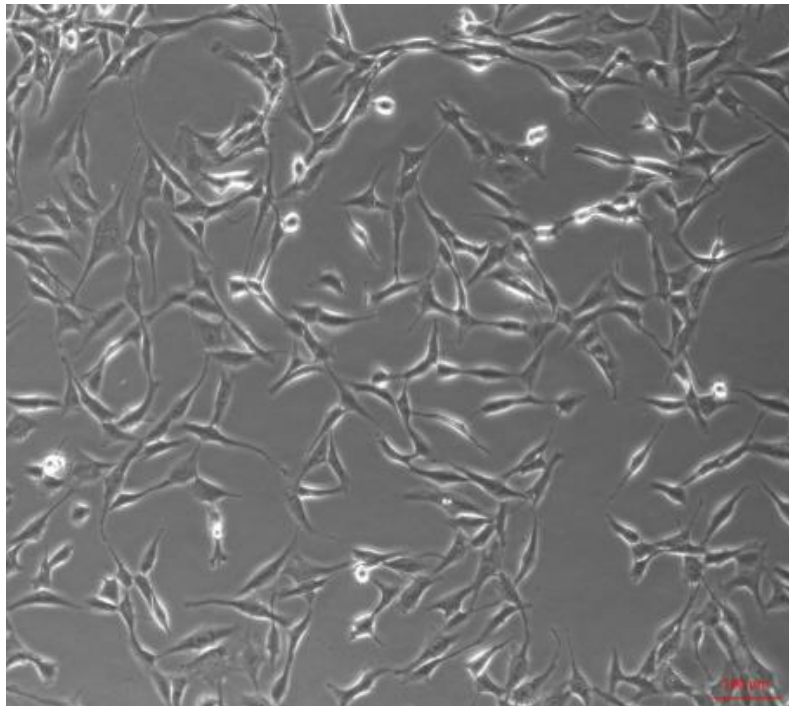


Figura 5. Morfologia da linha celular U87. Adaptada de (Zabłocka et al. 2015)

3. Adenosina (Ado)

A Ado é um nucleósido formado pela condensação de uma adenina e uma ribose³¹ e que está presente numa variedade de órgãos e tecidos³². Este metabolito está presente em situações fisiológicas e patológicas que resultam na degradação de nucleótidos de adenina.³³

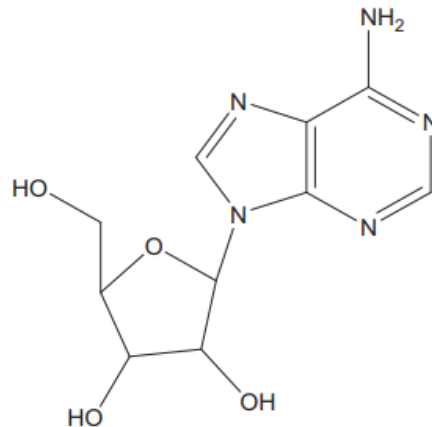


Figura 6. Estrutura da adenosina. Adaptada de (Sakshi Sachdeva e Monika Gupta, 2012)

3.1. Origem e metabolismo da Adenosina

O metabolismo do ATP e conversão nos seus metabolitos ADP, AMP e Ado é um processo rigorosamente regulado, devido ao papel importante que possui no metabolismo celular, sinalização celular e homeostasia imunológica³⁴.

A concentração basal intracelular da Ado encontra-se normalmente num intervalo de 30-200 nM³⁵, no entanto pode aumentar rapidamente através de dois mecanismos: um extracelular e outro intracelular. A Ado pode formar-se extracelularmente pela hidrólise enzimática do ATP extracelular pela ação sequencial das ectonucleodidases CD39 e CD73 e depois entrar na célula através dos transportadores de nucleósidos. Intracelularmente a Ado pode formar-se por hidrólise do monofosfato de adenosina (AMP), catalisada pela 5'-nucleotidase, e pela hidrólise da S-adenosil-homocisteína (SAH), catalisada pela hidrolase da S-adenosil-homocisteína (AHCY)³³. Esta formação contínua da Ado é contrariada pelo seu consumo, onde estão envolvidas duas enzimas que asseguram a concentração normal da Ado, quer intra- quer extracelular (Figura 7).^{36,37} Assim a Ado pode ser fosforilada a AMP, por ação da cinase da adenosina (ADK), contudo a Ado através da adenosina desaminase

(ADA) também pode ser convertida em inosina, sendo esta posteriormente metabolizada a ácido úrico³⁸. Ambas as reações catalisadas pela ADK e ADA ocorrem intracelularmente, sendo que a via pela ADK é favorecida quando existem baixas concentrações de Ado e a via pela ADA ocorre preferencialmente quando as concentrações de Ado são elevadas³⁹.

O transporte da Ado através da membrana celular é a via maioritariamente utilizada para remover este nucleósido do espaço extracelular⁴⁰. As concentrações de Ado intracelular e extracelular são mantidas pelos transportadores de nucleósidos, designados por transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENT1/ENT2) que transportam a Ado nas duas direções (bidirecionais) de acordo com o gradiente de concentração⁴¹. Em condições normais o gradiente de concentração é tal que o transporte de Ado é feito para dentro da célula, mas quando a concentração de Ado intracelular aumenta, a Ado pode ser transportada para fora da célula.⁴⁰ A Ado extracelular pode ser originada dos neurónios ou da glia – os astrócitos libertam ATP que é metabolizado extracelularmente a Ado pelas ectonucleotidases⁴⁰.

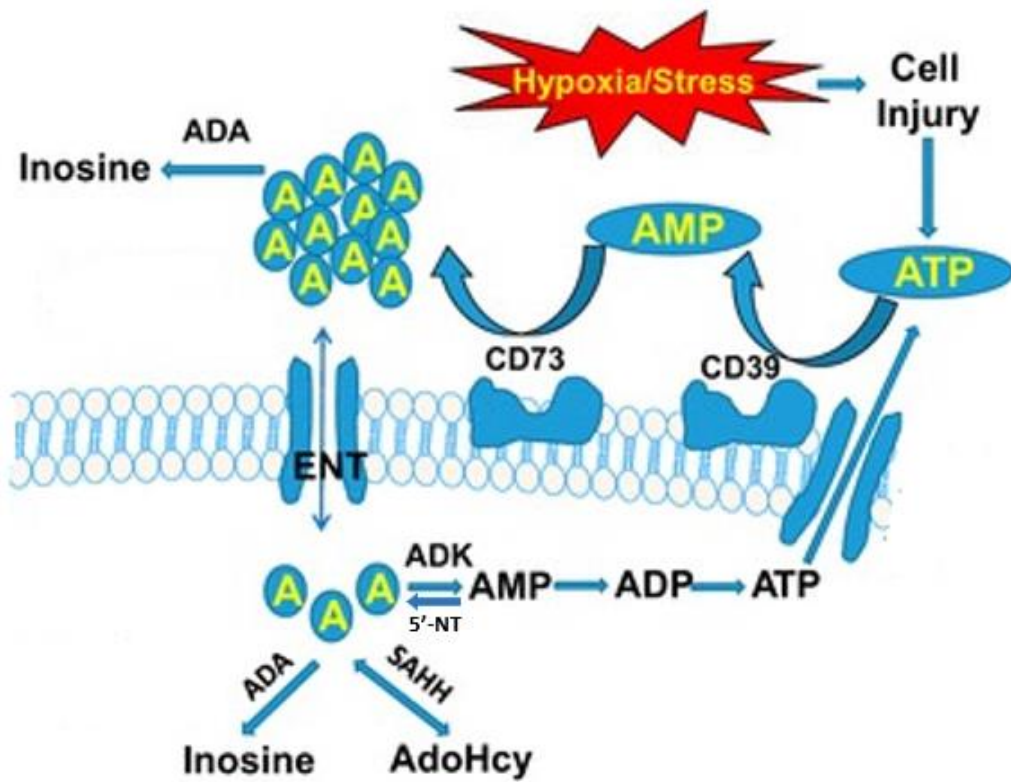


Figura 7. Metabolismo da adenosina. A – adenosina. Adaptada de (Hong Liu e Yang Xia, 2015).

3.2. Funções celulares da adenosina

A velocidade da formação da Ado é regulada pela atividade neuronal e os seus níveis começam a aumentar quando o fornecimento de oxigénio diminui, como por exemplo, em condições de hipóxia⁴⁰. Isto é considerado um mecanismo de proteção utilizado pelas células para minimizar os danos celulares, pois a Ado reduz a atividade celular, diminuindo desta forma, as necessidades energéticas das células⁴⁰. Os tumores sólidos, em consequência do seu crescimento rápido, possuem regularmente zonas de hipóxia e necrose⁴², causando a degradação de nucleótidos de adenina e a libertação de Ado. Esta vai exercer uma variedade de efeitos que beneficiam o estado maligno do tumor, fornecendo um ambiente de suporte – estimulação do crescimento⁴³, angiogénese⁴⁴, supressão de respostas imunes⁴⁵ – para o crescimento tumoral (Figura 8).

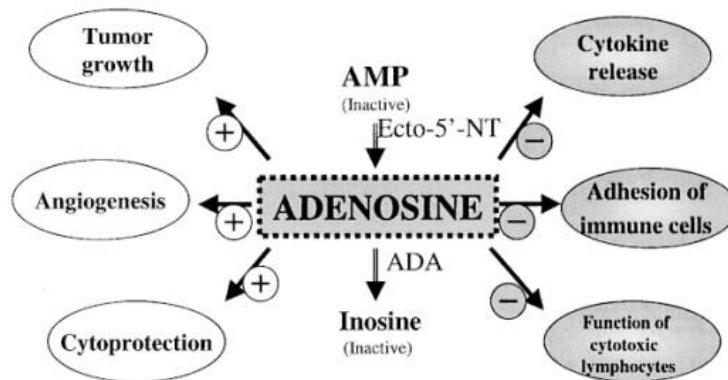


Figura 8. Adenosina e as suas funções promotoras tumorais (+) e imunossupressoras (-). Adaptada de (Spychala, 2000)

3.3. Recetores da adenosina

A Ado extracelular exerce o seu efeito através da ativação de quatro recetores (recetores purinérgicos P1) acoplados a proteínas G: acoplados a $G_{i/o}$ – A1 e A3, que diminuem os níveis de AMP cíclico (AMPc) intracelulares, sendo por isso considerados estimulantes do sistema imunitário; e acoplados a G_s – A2a e A2b, que aumentam os níveis de AMPc, sendo por isso considerados imunossupressores^{46,47}.

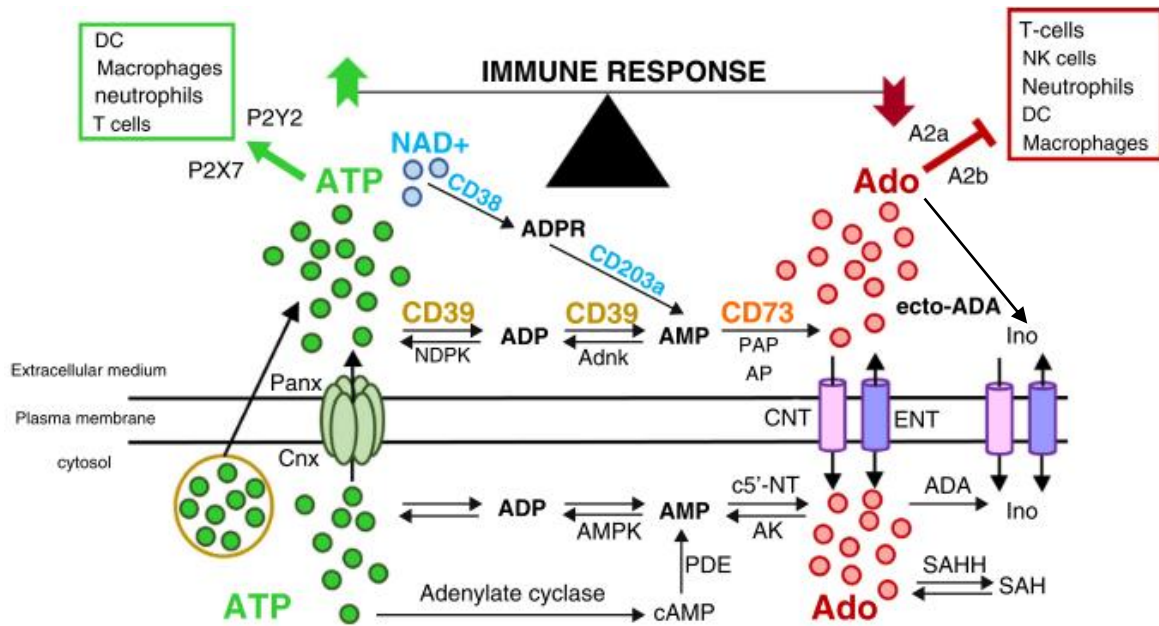


Figura 9. O equilíbrio entre o ATP extracelular e a Ado regulam as respostas imunitárias. Em condições de hipóxia, o ATP pode ser libertado no espaço extracelular – sob a forma de transportadores (canais panexina/conexina – Panx/Cnx, respetivamente ou canais P2X7 e transportadores ABC). Através desta libertação do ATP, as células do sistema imunitário deslocam-se ao local da lesão. Quando a resposta imunitária termina, o ATP é convertido a Ado. No espaço extracelular, a Ado pode ativar 4 subtipos de recetores acoplados à proteína G (recetores A1, A2a, A2b e A3). A ativação dos recetores A2a e A2b nas células imunitárias induzem efeitos imunossupressores através da inibição de várias vias sinalizadoras, mediadas por cAMP/PKA. Adaptada de Bertrand Allar (2016)⁴⁵ cAMP – AMP cíclico; PDE – Fosfodiesterase; AK – Adenosina Cinase; c5'-NT - 5'-nucleotidase citosólica; Adnk – Adenilato cinase; NDPK – Nucleósido – difosfato cinases; PAP – Fosfatase fosfatidato; AP – Fosfatase alcalina; AMPK – AMP cinase; Ino – Inosina; ADPR – ADP ribose; DC - Células Dendríticas.

Os recetores A1 e A2A têm uma maior afinidade para a Ado, sendo por isso, ativados a concentrações baixas desse nucleósido, enquanto que os recetores A2B e A3 possuem uma afinidade mais baixa para a Ado. Assim, estes recetores necessitam de concentrações mais elevadas para serem ativados, como acontece em condições de hipóxia³¹.

3.4. Enzimas envolvidas no metabolismo da adenosina

3.4.1. Ecto-5'-nucleotidase (NT5E)

A ecto-5'-nucleotidase, também designada por CD73 é uma enzima que está envolvida no metabolismo da Ado, tendo como função a conversão do AMP a Ado⁴⁸. É uma proteína codificada pelo gene NT5E⁴⁹ e encontra-se densamente expressa nas membranas celulares de glioblastoma²⁵. Está ligada à superfície externa da membrana celular por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI)⁵⁰ e possui funções enzimáticas e não enzimáticas na progressão tumoral, participando também em interações entre a célula tumoral e a matriz extracelular⁵¹.

A produção extracelular de Ado através da atividade desta enzima tem um papel importante na imunossupressão, angiogénese, proliferação celular e resistência à quimioterapia⁵², pois desfosforila o AMP para formar Ado, a qual vai ativar recetores da Ado acoplados à proteína G_s, que vai activar a ciclase do adenililo e aumentar os níveis intracelulares de AMPc, promovendo assim a agressividade das células cancerígenas⁵³. A Ado produzida por esta enzima possui um papel importante no escape das células tumorais ao sistema imunitário, pois conduz à inibição da actividade citotóxica dos linfócitos T.⁵³ Por outro lado, Bavaresco et al. (2008)⁴¹ observou que o tratamento de gliomas (linha celular U138MG) com a administração de um inibidor de CD73, o α,β -metileno-5'-difosfato de adenosina (APCP), causava uma redução significativa de 30% na proliferação celular, enquanto que o tratamento com Ado aumentava a proliferação celular em 35%⁵⁴. Estes resultados são indicativos de que a 5'-nucleotidase promove o crescimento celular cancerígeno por ação da sua função enzimática, ou seja, produção de Ado.⁵⁴

Esta é a enzima limitante da velocidade na via de degradação do ATP extracelular e a reacção catalisada por esta enzima é irreversível. Apenas depois do transporte da Ado para o meio intracelular, esta pode ser convertida a AMP pela cinase da adenosina (ADK).⁵⁵ Recentemente esta via (CD73-Ado) foi considerada muito significativa pelo seu envolvimento na formação do microambiente imunossupressor em tumores distintos⁵⁵.

3.4.2. Adenosina Desaminase (ADA)

A desaminase da adenosina, também conhecida por aminohidrolase da adenosina (ADA) é uma enzima que converte a Ado a inosina⁵⁶ e a sua deficiência está associada a anormalidades no funcionamento de vários órgãos, incluindo no SNC⁵⁷.

A expressão desta enzima encontra-se em níveis variáveis em todos os tipos celulares do SNC, sendo que a sua distribuição não é homogênea no SNC⁵⁸. No entanto, num estudo realizado por Ö. Akyol, et al.⁵⁹, onde foram utilizadas amostras de glioblastoma, foi observado que a atividade da ADA é menor nesses tecidos, quando comparada com os tecidos não tumorais, o que tenderia a aumentar os níveis de Ado nestes tumores⁵⁹.

3.4.3. Cinase da Adenosina (ADK)

A cinase da adenosina é uma enzima que faz parte do metabolismo da Ado e é responsável pela fosforilação da Ado intracelular a AMP⁶⁰ e é a enzima metabólica com a maior afinidade para a Ado.⁶¹ Uma vez que a expressão de ADK diminui com a redução das concentrações de oxigénio, as concentrações de Ado permanecem altas em condições de hipóxia³⁸. Além disso, esta enzima também possui um papel importante nas reações de transmetilação, uma vez que estas só podem ser mantidas quando a Ado é constantemente removida pela ADK⁶¹.

No cérebro adulto, em condições normais, a ADK é expressa predominantemente nos astrócitos e em tumores astrocitários humanos, encontra-se sobreexpressa.⁶¹

3.4.4. Hidrolase da S-adenosil-homocisteína (AHCY)

A hidrolase da S-adenosil-homocisteína (AHCY) é uma enzima que catalisa a hidrólise reversível da SAH para formar Ado e homocisteína⁶². A redução da sua atividade pode resultar em níveis elevados de SAH, com uma redução do rácio S-adenosilmetionina (SAM)/SAH e, deste modo, prejudicar o ciclo da metilação⁶². Em condições normais, a remoção de Ado e homocisteína é suficientemente rápida para manter a reação no sentido da hidrólise⁶³. No entanto, em lesões malignas são observadas alterações no estado de metilação do DNA e das histonas. O silenciamento epigenético de genes supressores de tumor através da metilação do DNA e modificação das histonas é um evento que ocorre na carcinogénese⁶³.

A metilação do DNA é mediada por enzimas designadas por metiltransferases do DNA (DNMTs)⁶⁴. Estas catalisam a transferência de um grupo metilo da S-adenosilmetionina (SAM) para as bases de citosina do DNA⁶⁵. Depois desta metilação do DNA, a SAM é convertida a SAH, sendo esta um potente inibidor das metiltransferases dependentes da SAM, que têm maior afinidade para o inibidor do que para o substrato⁶⁶. Um aumento da concentração da SAM estimula as reações das DNMTs e inibe a atividade das desmetilases intracelulares, resultando numa hipermetilação do DNA. No entanto, um aumento da concentração da SAH leva a uma inibição das DNMTs e, conseqüentemente, hipometilação do DNA⁶⁵.

A adenosina pode promover modificações epigenéticas quando atinge elevadas concentrações, como consequência da inversão do sentido da reação catalisada pela AHCY e aumento da concentração de SAH, conduzindo assim a uma hipometilação do DNA.^{38,67}

3.4.5. Transportadores de Adenosina

3.4.5.1. Transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENTs)

Os níveis extracelulares da Ado são geralmente baixos, no entanto podem aumentar em condições de hipóxia. Estes níveis são controlados pelo balanço entre a sua produção e degradação através de enzimas e por processos de transporte transmembranares⁶⁸.

Os transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENTs) são proteínas transmembranares que facilitam o transporte dos nucleósidos através da membrana celular de uma forma bidirecional⁴⁰ e a sua expressão é um biomarcador preditivo para a eficácia dos fármacos no tratamento de diversos cancros⁶⁹. O ENT1 e o ENT2 medeiam o influxo ou o efluxo da Ado e este movimento é dependente das concentrações relativas da Ado intra e extracelulares. Ambos têm uma expressão elevada no cérebro^{41,70}.

Relativamente ao ENT1, sabe-se que este é o transportador de nucleósidos mais abundante e distribuído pela membrana celular no SNC humano e liga-se à Ado e deoxiadenosina mas não interage com outros nucleósidos ou deoxinucleósidos, o que sugere uma elevada especificidade para bases de adenina^{69,71}.

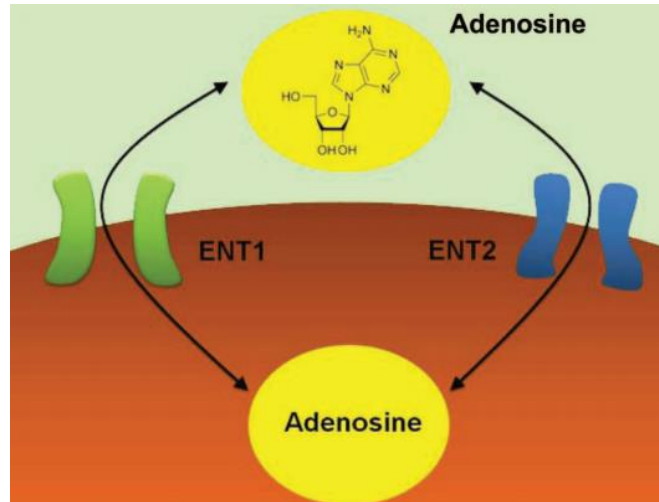


Figura 10. *Uptake* da adenosina através dos transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENTs) de acordo com o gradiente de concentração. Adaptada de (Eltzschig, 2009).

I. Objetivo

O glioblastoma é o tumor cerebral mais comum e agressivo em adultos. Regiões de hipoxia são comuns no glioblastoma, estando associadas ao crescimento e progressão tumoral. A adenosina é gerada durante episódios de hipoxia e estudos recentes mostraram um efeito promotor tumoral da adenosina em glioblastoma. Por outro lado, está descrito um aumento da expressão da ecto-5'-nucleotidase, e um consequente aumento da produção extracelular de adenosina, em glioblastoma comparativamente a astrócitos normais. No entanto a alteração da expressão das restantes enzimas intervenientes no metabolismo da adenosina, comparativamente a astrócitos humanos normais não está esclarecida.

O objetivo principal desta dissertação é:

- Determinar qual a expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da Ado em linhas celulares de glioblastoma multiforme humano e comparar a mesma com a observada em astrócitos humanos normais.
- Investigar como as linhas celulares de GBM e os astrócitos humanos reagem em presença de altas concentrações de Ado, quer em termos de proliferação/sobrevivência celular quer em termos da expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da adenosina

II. Materiais e métodos

1. Materiais e reagentes

O meio Dulbecco's Medium Eagle Medium (DMEM) foi obtido da Biowest, o Fetal Bovine Serum (FBS) da Biochrom e o meio dos astrócitos Astrocyte Medium da ScienCell. Os fármacos 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), 2-(2-Furanil)-7-(2-feniletil)-7H-pirazol[4,3-e][1,2,4]triazol[1,5-c]pirimidina-5-amina (SCH 58261), N-[2-(2-Furanil)-8-propil-8H-pirazol[4,3-e][1,2,4]triazol[1,5-c]pirimidina-5-yl]-N'-(4-metoxifenil)ureia (MRE 3008F20), N-(4-Cianofenil)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahidro-2,6-dioxo-1,3-dipropil-1H-purina-8-yl)fenoxil]-acetamida (MRS 1754) e 4-Amino-5-(3-bromofenil)-7-(6-morfolinopiridina-3-yl)pirido[2,3-d]pirimidina (ABT 702) foram obtidos de Tocris (Bristol, UK). A Ado, gentamicina e o TriReagent foram obtidos da Sigma-Aldrich e o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) da VWR Life Science. O kit da síntese de cDNA (RevertAid First Strand cDNA synthesis kit) e DNase I da Thermo Scientific. Os primers foram adquiridos da Stab Vida. Por fim, o kit de PCR convencional (Speedy NZYTaQ 2x Green Master Mix) e do qPCR (NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x)) foram obtidos da NZYTech.

2. Células primárias e linhas celulares de glioblastoma

Neste estudo foram utilizadas células primárias de astrócitos humanos (HA) de córtex cerebral adquiridos à ScienCell. Utilizaram-se também as linhas celulares de glioblastoma humanas U373 e U87, gentilmente fornecidas pelo Dr. Joseph Costello (Universidade da Califórnia, San Francisco), e a linha SNB19, obtida da Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas de Células.

2.1. Condições de cultura

Os diferentes tipos de células foram semeados com diferentes densidades, uma vez que as células crescem a velocidades distintas assegurando que no fim dos ensaios experimentais há aproximadamente o mesmo número de células independentemente do tipo celular utilizado. Foram utilizadas as seguintes densidades de semeio: 1800

células/cm² para a linha U373, 6500 células/cm² para os HA e a linha U87 e 4800 células/cm² para a linha SNB19.

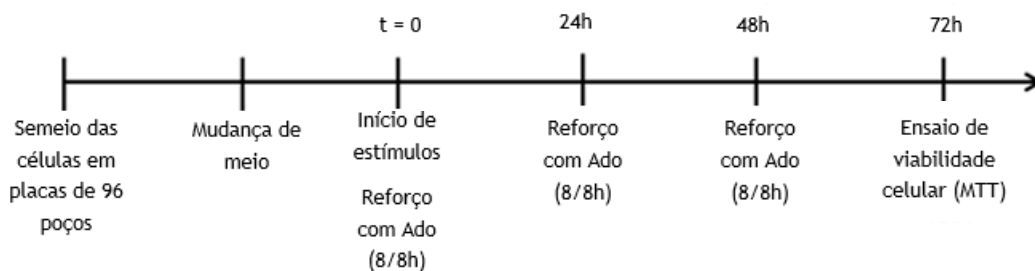
As células primárias de astrócitos humanos foram semeadas em placas revestidas com poli-L-lisina (1 mg/ml; ScienCell) e mantidas em meio de cultura (*Astrocyte medium*; ScienCell), enriquecido com 0,01% de *Astrocyte Growth Supplement* (AGS; ScienCell), 0,01% de penicilina/estreptomicina (P/S; ScienCell) e 10% de soro bovino fetal (FBS Superior; ScienCell).

As linhas celulares foram semeadas e mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Biowest), enriquecido com 10% de soro bovino fetal (FBS Superior; Biochrom) e 0,1% de gentamicina (Sigma-Aldrich).

Todas as células foram mantidas numa incubadora a 37°C, numa atmosfera humidificada, com 5% de CO₂.

2.2. Estímulos

Para avaliar a viabilidade/proliferação celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços, de forma randomizada, de modo a assegurar a reprodutibilidade do ensaio, e deixadas a crescer durante 48h. Passado este período os fármacos/veículo foram adicionados e a incubação prosseguiu por mais 72h. Seis condições foram definidas (cada uma com seis replicados): 1) meio; 2) células + meio; 3) controlo-veículo; 4) Ado 30 µM; 5) cocktail de Antagonistas dos recetores da Ado (CA); 6) CA + Ado 30 µM. Além da Ado também foi utilizado um inibidor da ADK, o ABT-702 (30 µM) onde similarmente definiram-se seis condições (cada uma com seis replicados): 1) meio; 2) células + meio; 3) controlo-veículo; 4) ABT-702 30 µM; 5) CA; 6) CA + ABT-702 30 µM. Uma vez que a Ado é muito rapidamente metabolizada, foram feitos reforços de 8 em 8 horas de forma a manter a concentração intracelular de Ado alta. Nos ensaios em que o cocktail de antagonistas dos recetores de adenosina foi utilizado, este foi aplicado às células 30 minutos antes da primeira aplicação de adenosina ou ABT-702. No ensaio de controlo-veículo, o volume da solução do fármaco(s) adicionado(s) ao poço era substituído pelo mesmo volume de veículo. Passadas 72h do início do ensaio, realizou-se o ensaio de viabilidade/proliferação celular pelo método do brometo de MTT.



Esquema 1. *Timeline* da realização experimental relativa ao ensaio de viabilidade celular (MTT). Início do ensaio considerado tempo zero (t=0); passadas 8 horas do início do ensaio iniciam-se os reforços de Ado de 8 em 8 horas. Às 72h após o t=0, o ensaio termina com a realização do ensaio de viabilidade celular.

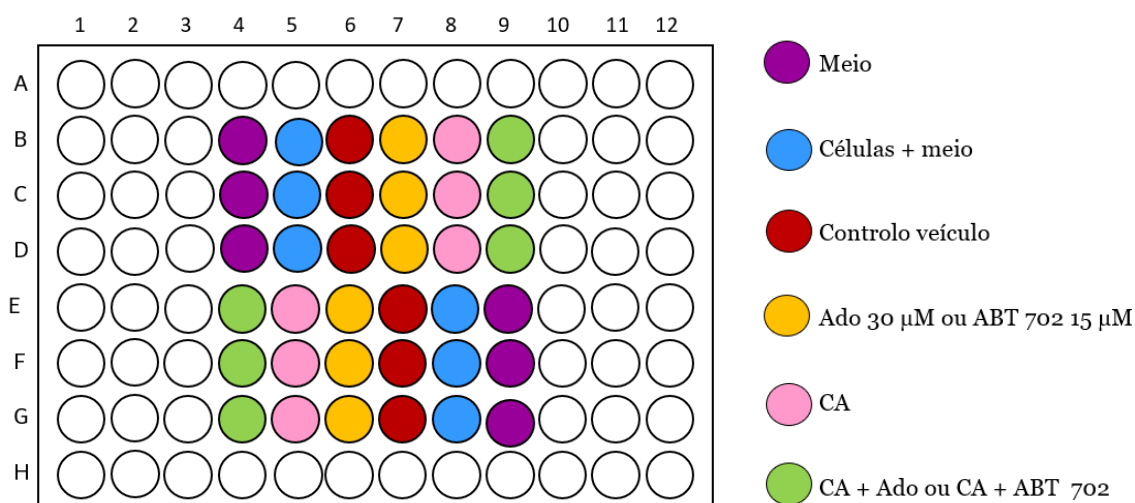
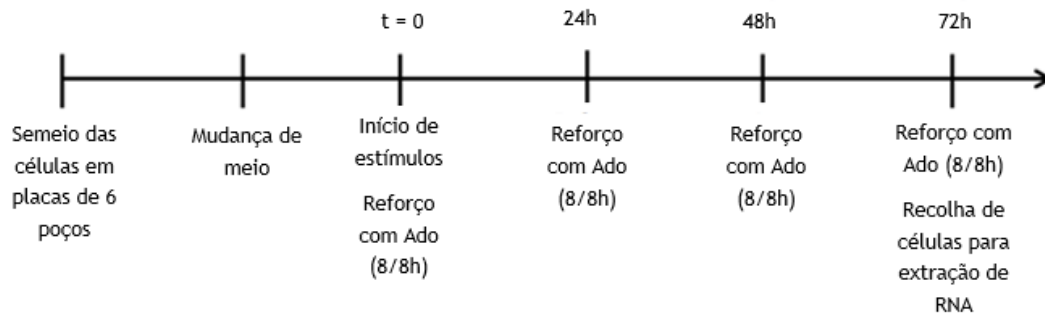


Figura 11. Disposição das placas de 96 poços, estimuladas com Ado 30 µM ou ABT-702 30 µM, cocktail de antagonistas (CA), CA + Ado ou CA + ABT-702.

Para a avaliação do metabolismo da Ado, as células foram semeadas em placas de 6 poços, de forma randomizada, de modo a assegurar a reprodutibilidade do ensaio. Foram realizadas seis condições em quadruplicado: 1) controlo-veículo; 2) Ado 30 µM; 3) ABT-702 15 µM; 4) CA; 5) CA+Ado 30 µM e 6) CA+ABT-702 15 µM. Passadas 72h do início do ensaio as células foram recolhidas para posterior extração de RNA total.



Esquema 2. *Timeline* da realização experimental relativa à recolha de células para posterior extração de RNA. Início do ensaio considerado tempo zero (t=0); passadas 8 horas do início do ensaio iniciam-se os reforços de Ado de 8 em 8 horas. Às 72h após o t=0, o ensaio termina com a recolha das células para a posterior extração de RNA.

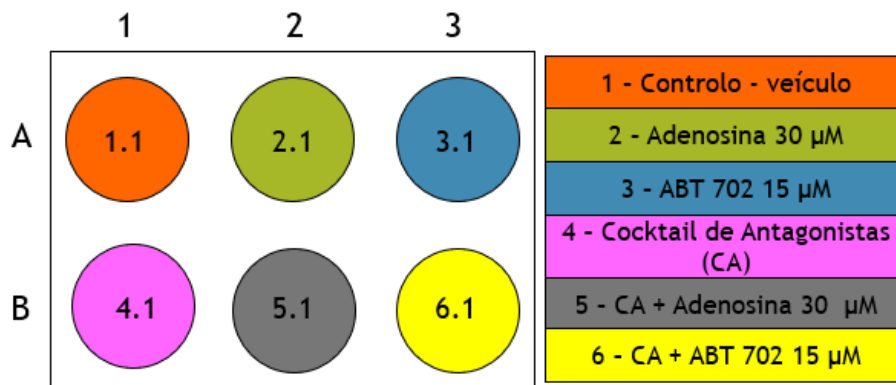


Figura 12. Disposição das placas de 6 poços, estimuladas com Ado 30 µM (condição 2), ABT-702 15 µM (condição 3), cocktail de antagonistas (CA) (condição 4), CA + Ado 30 µM (condição 5) e CA + ABT-702 15 µM (condição 6).

2.3. Ensaio de MTT

A viabilidade/proliferação celular foi avaliada pela redução, catalisada por desidrogenases celulares, do MTT. Para isso, o meio de cultura foi retirado da placa e adicionaram-se 100 μ L de meio de cultura completo novo por poço. Na ausência de luz intensa, adicionaram-se 10 μ L do reagente MTT (5 mg/10 mL, dissolvido em DMSO). As placas foram posteriormente colocadas na incubadora, a 37°C, até ocorrer a formação de cristais (nunca ultrapassando as 4 horas de incubação). O meio foi removido e os cristais de formazam formados a partir da redução do MTT, foram dissolvidos com 100 μ L de DMSO. Por fim, a absorvência a 570 nm em cada poço da placa foi lida num espectrofotômetro. Para avaliar o efeito de um fármaco/veículo na viabilidade celular, a absorvência a 570 nm correspondente ao ensaio do fármaco/veículo foi expressa como a percentagem da absorvência em 570 correspondente ao ensaio de só com células + meio. Uma vez que a absorvência a 570 nm é diretamente proporcional ao número de células presentes em cada poço, o ensaio do MTT foi também usado como uma medida indireta da proliferação celular.

2.4. Recolha de células

Para a posterior extração de RNA, as células, mantidas em placas de 6 poços, foram tripsinizadas. Resumidamente, o meio de cultura foi retirado e a placa foi lavada duas vezes com *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS). Depois da lavagem, foram adicionados 200 μ l de solução de tripsina/EDTA (ScienCell) em 1 ml de DPBS, e as células foram incubadas a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Quando se verificou o descolamento das células, adicionou-se meio de cultura completo, contendo 20% de FBS, de modo a parar a reação da tripsina. De seguida, recuperaram-se as células para um eppendorf e centrifugou-se à velocidade máxima (14000 rpm) numa centrifuga mini-spin, durante 2 minutos, descartando-se o sobrenadante depois da centrifugação. Com o objetivo de se recuperar o máximo de células possível realizou-se uma nova lavagem dos poços com DPBS e centrifugou-se novamente à velocidade máxima numa mini-spin, durante 2 minutos, descartando-se o sobrenadante. Por fim, os eppendorfs foram colocados imediatamente em azoto líquido para posteriormente serem guardados na arca congeladora a -80°C.

3. RNA total

3.1. Extração de RNA total

A extração de RNA foi efetuada com TriReagent (Sigma-Aldrich) seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, aos pellets das células recolhidas, foram adicionados 200 μL de TriReagent homogeneizando-as (*up/down* com micropipeta e vórtex). Depois das amostras serem deixadas à temperatura ambiente durante 5 minutos, foi adicionado clorofórmio (40 μl) a cada eppendorf e agitaram-se vigorosamente por 15 segundos, deixando-se novamente à temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12000g durante 15 minutos, a 4°C em que houve a formação de 3 fases distintas. A fase superior, a fase aquosa contendo o RNA, foi transferida para novos tubos e foi adicionado isopropanol (100 μl) para precipitar o RNA total. As amostras foram deixadas novamente à temperatura ambiente durante 10 minutos. De novo, as amostras foram centrifugadas a 12000g, durante 10 minutos, a 4°C (precipitação do RNA). O sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado adicionando-se 1 mL de etanol a 75% em H₂O tratada com dicarbonato de dietilo (DEPC, 0,1%). De seguida, as amostras foram centrifugadas a 7500g durante 5 minutos a 4°C. Depois da remoção do sobrenadante, secou-se o pellet ao ar. Por fim, as amostras foram ressuspensas em volume apropriado de H₂O DEPC e estas foram guardadas a -80°C.

3.2. Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total foi determinada usando-se um nanoespectrofotómetro (NanoPhotometer, Impln, Germany), que fornece a concentração do RNA em ng/ μL e o rácio A260/A280, que indica a pureza do ácido nucleico extraído. Considera-se que o RNA está puro quando o rácio das absorvâncias se encontra num intervalo de 1,8-2,0.

3.3. Determinação da integridade do RNA

Para se verificar a integridade do RNA extraído, realizou-se uma separação deste com uma eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com *GreenSafe* (NZYTech, Ltd.). As amostras foram preparadas com 2 μL de RNA, 8 μL de H₂O-DEPC e 1 μL de *loading buffer* 10x e depositadas no gel. O gel de agarose foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) utilizando

um transiluminador (UVITEC Cambridge) e a integridade das amostras foi confirmada pela presença de duas bandas de rRNA – 28S e 18S (intensidade da banda correspondente ao rRNA 28S tem que ser aproximadamente o dobro da banda correspondente ao rRNA 18S).

4. Transcrição Reversa

4.1. Tratamento com DNase

De acordo com as recomendações do fabricante (ThermoFisher Scientific) a um tubo RNase/DNase-*free* adicionou-se 1 µg de RNA, 1 µL de tampão com MgCl₂ (10x), 1 µL de DNase I e perpez-se com H₂O DEPC, para um volume total de 10 µL. Num termociclador (BioRad) incubaram-se os tubos a 37°C durante 30 minutos, adicionou-se 1 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 1mM de concentração final) e incubou-se a 65°C durante 10 minutos. Por fim, o RNA tratado foi usado como amostra para a síntese de cDNA.

4.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de DNA complementar foi realizada a partir do RNA tratado previamente com DNase e foi usada a enzima transcriptase reversa (RevertAid M-MuLV RT, ThermoFisher Scientific). Assim, de acordo com as recomendações do fabricante, aos tubos com o RNA tratado foi adicionado 1 µL de *primer random hexamer* (ThermoFisher Scientific), incubou-se a 65°C durante 5 minutos, e arrefeceu-se em gelo. Preparou-se uma mistura (para n+1 reações) com 4 µL de tampão de reação, 1 µL de inibidor de RNases (Robolock RNase Inhibitor, ThermoFisher Scientific), 2 µL de mistura de nucleótidos (10 mM Mix dNTP, ThermoFisher Scientific) e 1 µL da enzima (RevertAid M-MuLV RT, ThermoFisher Scientific). Por cada tubo foram adicionados 8 µL da mistura preparada, misturou-se gentilmente e realizou-se um “spin”. De seguida, as amostras foram incubadas a 25°C durante 5 minutos e a 45°C durante 60 minutos. Por fim, a reação foi terminada por incubação a 70°C durante 5 minutos. A cadeia de cDNA sintetizada foi posteriormente utilizada como *amostra* para as reações de PCR convencional e PCR em tempo real.

5. PCR

5.1. Desenho de primers

Para o desenho dos primers utilizados no PCR (tabela 1) em tempo real foi utilizado o programa da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Primer-BLAST*.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados e tamanho do produto de PCR respectivo

Gene	ID	Primer Forward	Primer Reverse	Tamanho do produto (bp)
ACTB (β -actina)	NM_001101.5	TTCCTGGGCATGGAGTCCT	AGGAGGAGCAATGATCTTGATC	204
ADK (Cinase da Adenosina)	NM_001123.3	TACCAATGGAGCTGGAGATGC	GTGCAGCCAGTCCGTCTAAT	129
ADA (Deaminase da Adenosina)	NM_000022.4	GGCTAACTACTCGCTCAACA	CGCATTGATGTTTCAGCCTTT	127
AHCY (hidrolase da S-adenosil-homocisteína)	NM_000687.4	CCAGACAAGTACCCCGTTGG	ACAGCAGCTGGAGGGTGAAA	208
NT5E (ecto-5'-Nucleotidase)	NM_002526.4	GCTGCTGTATTGCCCTTTGG	GGGTCATAACTGGGCACTCG	224
SLC29A1 (Transportador equilibrativo de nucleósidos 1)	NM_001078177.1	GTGGCTCGGAGCTATCAGAA	TGGGCTGAGAGTTGGAGACT	237
SLC29A2 (Transportador equilibrativo de nucleósidos 2)	NM_001300868.1	ACCATGCCCTCCACCTACAG	CCCACACAGGGCGTGATAAA	146

5.2. PCR convencional

Seguindo-se as recomendações do fabricante, foi realizada uma mistura (para n+2 reações) contendo 5 µl/tubo da enzima Taq polimerase (Speedy NZY Taq 2x Green Master Mix; NZY Tech), 0,4 µl/tubo dos *primers forward* e *reverse* (os *primers* foram primeiro diluídos de 1:10 de uma solução stock a 0,4 µM) de cada gene a testar e 3,2 µl/tubo H₂O estéril. Desta mix foram adicionados 9 µL em cada tubo de PCR e 1 µL de cada amostra de cDNA. Aos controlos negativos (sem cDNA) adicionou-se o mesmo volume de H₂O estéril. De seguida, os tubos foram colocados no termociclador (BioRad) e as amostras foram colocadas a 95°C durante 5 minutos. Seguiram-se 40 ciclos a 95°C durante 5 segundos (desnaturação do DNA), *annealing* dos *primers* às cadeias simples de DNA desnaturadas (onde se testaram diferentes temperatura — gradiente de temperaturas — durante 10 segundos) e extensão das cadeias de DNA, onde os *primers* se ligaram, a 72°C durante 3 segundos. Por fim, as amostras foram expostas a um ciclo a 72°C durante 5 minutos. Depois de terminadas as reações de PCR, os produtos foram separados por electroforese num gel de agarose a 2%, juntamente com um conjunto de marcadores de massas moleculares (NZY ladder VI, NZY Tech).

6. PCR em Tempo Real

A realização da técnica de PCR em tempo real permitiu a quantificação relativa dos genes NT5E, ENT1, AHCY, ENT2, ADK e ADA, utilizando o gene da β-actina como referência (*housekeeping*), depois dos estímulos com Ado e ABT-702 das células de glioblastoma e das células de astrócitos, em estudo.

6.1. Curvas de eficiência

Primeiramente o procedimento foi otimizado através da realização de uma curva de eficiência para cada gene usando 5 diluições seriadas de cDNA para que a eficiência de amplificação produzida pelos primers estivesse entre 95% - 105%.

6.2. Determinação da expressão génica

Para a quantificação das amostras foram seguidas as recomendações do fabricante. Foi feita uma mistura de 5µl/tubo de SYBRGreen (NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x); NZY Tech), 0,4µl/tubo os *primers forward* e *reverse* de cada gene a analisar e 3,2µl/tubo H₂O estéril. A cada poço de uma placa de *realtime* foram adicionados 9 µL da mistura preparada e posteriormente 1 µL da amostra de cDNA diluída previamente; nos poços do controlo negativo pipetou-se o mesmo volume de H₂O estéril em vez de amostra. A placa foi colocada no aparelho de PCR (Real-Time System CFX Connect; BioRad), e as condições de amplificação foram as seguintes: 95°C, durante 2 minutos, 40 ciclos a 95°C, durante 5 segundos, 60°C, durante 10 segundos e 72°C durante 3 segundos. O gene da β-actina foi utilizado como controlo endógeno.

7. Análise de dados e estatística

Os resultados obtidos do *real-time* PCR foram analisados usando o método Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$), que compara os Ct das amostras com os Ct do controlo, sendo estes normalizados pelos Ct obtidos do gene de referência (β-actina). A análise estatística da expressão dos genes em estudo, NT5E, ADK, ADA, ENT1, ENT2 e AHCY foi realizada usando o GraphPad Prism (versão 8). Para comparação entre grupos foi usado o teste estatístico One-Way ANOVA com *post-hoc Tukey* e DMS (Diferença Média Significativa). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

IV. Resultados

1. Efeito do aumento da concentração de Ado na viabilidade/proliferação celular em HA e linhas de GBM

O ensaio de MTT permitiu quantificar o efeito do aumento da concentração de adenosina na viabilidade/proliferação celular das linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19) e dos astrócitos humanos (HA). O aumento da concentração de adenosina foi conseguido por dois processos: 1) Adição de adenosina exógena e 2) inibição da remoção da adenosina por inibição da ADK, a principal enzima responsável pelo consumo de Ado em astrócitos, utilizando um inibidor seletivo, o ABT-702.

O envolvimento ou não dos recetores da Ado na mediação do efeito da Ado na proliferação/viabilidade celular foi investigado através da realização de ensaios nos quais o efeito da Ado/ABT-702 na proliferação/viabilidade celular obtido na presença de cocktail de antagonistas de todos os recetores da Ado (CA), era comparado com o efeito obtido na ausência de CA. Foram utilizados os seguintes antagonistas, nas concentrações indicadas: 15 μM -DPCPX, 10 μM -SCH 58261, 0,1 μM -MRS 1754 e 1,5 μM -MRE 3008F20; estas concentrações são capazes de bloquear efetivamente e seletivamente a ativação pela adenosina dos recetores A1, A2a, A2b e A3 humanos da adenosina, respetivamente (Fredholm et al., 2001⁷²).

1.1. Efeito da Ado exógena na viabilidade/proliferação celular

As figuras apresentadas seguidamente dizem respeito às percentagens de viabilidade celular, relativamente ao ensaio só com células+meio, obtida nos quatro tipos de células (figuras 13, 14, 15 e 16: HA, U373, U87 e SNB19, respetivamente) nas condições de controlo (veículo), Ado 30 μM , CA e CA+Ado.

Quando comparado com o controlo verifica-se que em HA (figura 13), a percentagem de viabilidade celular diminui significativamente nas condições de Ado 30 μM ($P < 0,01$, Tukey e $P < 0,0001$ DMS) e também nas condições de CA ($P < 0,0001$, Tukey e DMS) e de CA+Ado ($P < 0,0001$, Tukey e DMS). Comparando a condição CA com a de CA+Ado 30 μM não se observou diferença na viabilidade celular ($P > 0,05$, Tukey e DMS).

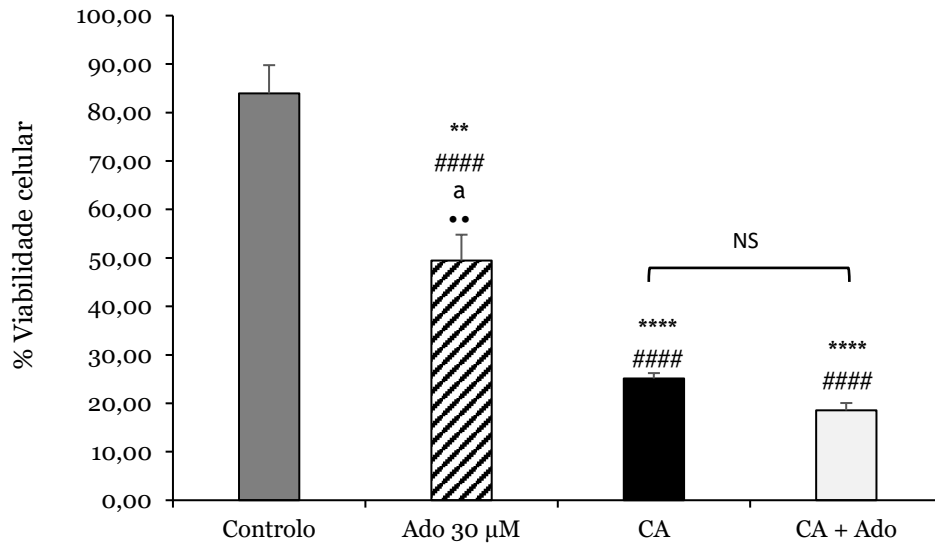


Figura 13. Viabilidade/proliferação celular de HA nas condições de controlo, Ado 30 μM, CA e CA + Ado. As barras representam a média ± EPM (Erro Padrão da Média) da % de viabilidade/proliferação celular correspondente ao ensaio só com células+meio, n=3 (**P<0,01, Tukey ####P<0,0001, DMS, ****,####P<0,0001, Tukey e DMS, respetivamente vs Controlo) (ªP<0,05, Tukey; ••P<0,01, DMS vs CA). NS- Não significativamente diferente

Quanto às linhas celulares de GBM, nas linhas U373 (figura 14), a percentagem de viabilidade celular não apresenta diferenças significativas na condição de Ado 30 μM e diminui na presença de CA (P<0,05, Tukey e p<0,01, DMS) e de CA + Ado (P<0,05, DMS), relativamente ao controlo. Comparando a condição CA com a de CA+Ado 30 μM não se observou diferença na viabilidade celular (P>0,05, Tukey e DMS).

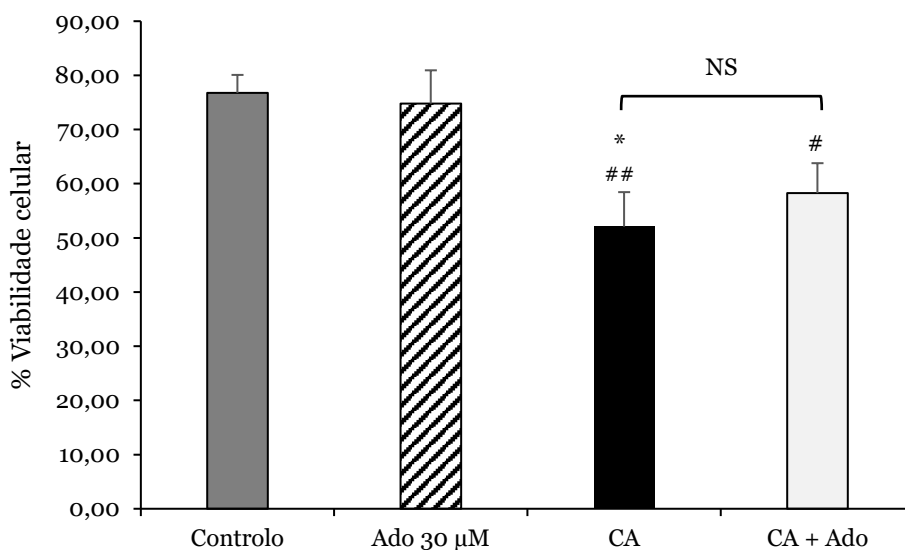


Figura 14. Percentagem de viabilidade celular de U373 nas condições de controlo, Ado 30 µM, CA e CA + Ado. As barras representam a média ± EPM da % de viabilidade/proliferação celular correspondente ao ensaio só com células+meio, n=4 (*, #P<0,05, Tukey e DMS, respetivamente; ##P<0,01 DMS, vs Controlo).

Na linha celular U87 (figura 15) não se observam diferenças significativas em nenhuma das condições comparativamente ao controlo. Por fim, na linha celular SNB19 (figura 16), verifica-se que a percentagem de viabilidade celular não apresenta diferenças significativas na condição de Ado 30 µM e diminui significativamente na presença de CA (P<0,05, Tukey e P<0,01, DMS) e de CA + Ado (P<0,01, Tukey e DMS), relativamente à condição controlo. Comparando a condição CA com a de CA+Ado 30 µM não se observou diferença na viabilidade celular (P>0,05, Tukey e DMS).

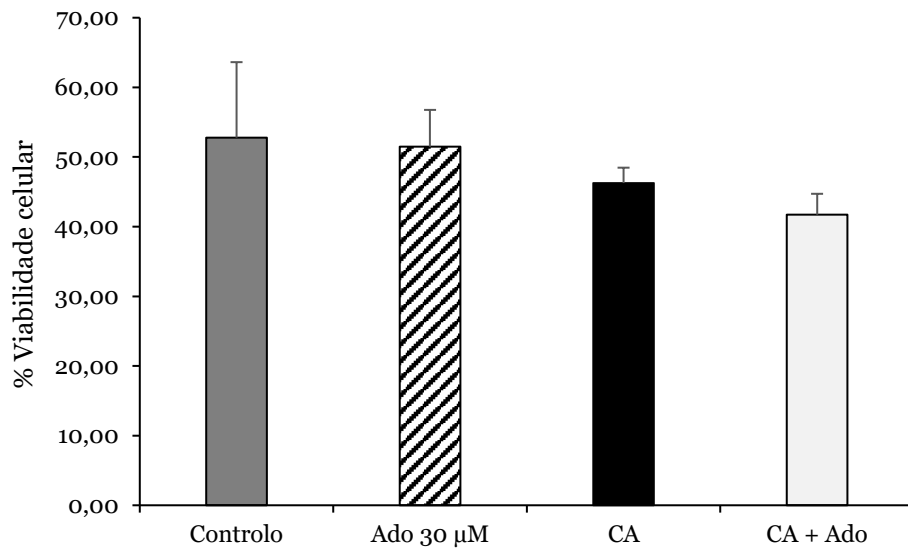


Figura 15. Percentagem de viabilidade celular de U87 nas condições de controlo, Ado 30 µM, CA e CA + Ado. As barras representam a média ± EPM da % de viabilidade/proliferação celular correspondente ao ensaio só com células+meio, n=4.

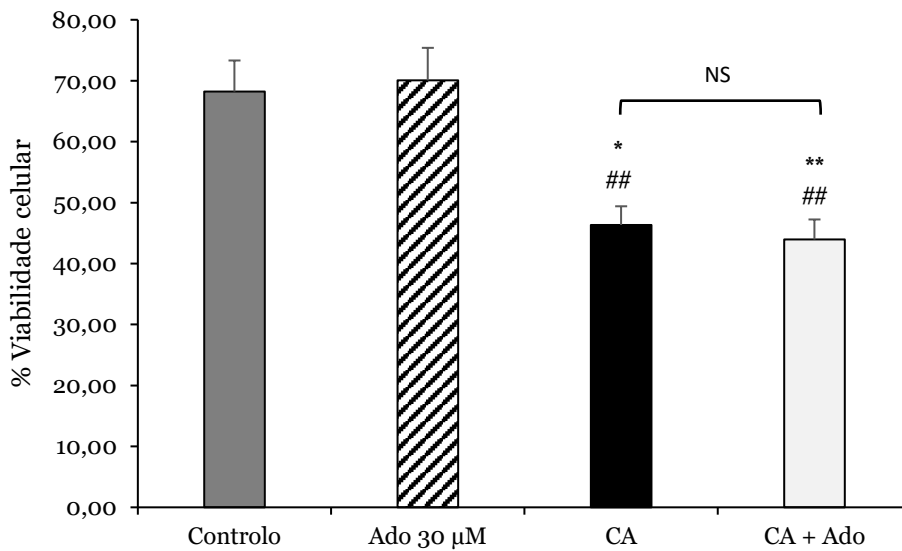


Figura 16. Percentagem de viabilidade celular de SNB19 nas condições de controlo, Ado 30 µM, CA e CA + Ado. As barras de erro representam a média ± EPM da % de viabilidade/proliferação celular correspondente ao ensaio só com células+meio, n=4 (*, #P<0,05, Tukey e DMS, respetivamente; **, ##P<0,01 Tukey e DMS, respetivamente vs Controlo).

Em conclusão, ao contrário dos HA, a Ado (30 μ M) não afetou a viabilidade/proliferação celular em nenhuma das linhas celulares de GBM estudadas, quer na ausência quer na presença de CA. A diminuição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo CA nos HA e nas linhas U373 e SNB19, sugere que a Ado endógena em condições basais poderá estar a exercer um efeito protetor nestas células via ativação dos recetores da Ado, efeito protetor esse que é bloqueado pela presença do CA.

1.2. Efeito do ABT-702 na viabilidade/proliferação celular

As figuras a seguir apresentadas dizem respeito às percentagens de viabilidade celular, relativamente ao ensaio só com células+meio, obtida nos quatro tipos de células (figuras 17, 18, 19 e 20: HA, U373, U87 e SNB19, respetivamente) nas condições de controlo (veículo), ABT-702 30 μ M, CA e CA+ABT-702.

Como podemos observar na figura 17, em HA verifica-se que a percentagem de viabilidade celular diminui na presença de ABT-702 30 μ M ($P < 0,001$, Tukey e DMS), CA ($P < 0,05$, Tukey e $P < 0,01$, DMS) e de CA+ABT-702 ($P < 0,001$, Tukey e $P < 0,0001$, DMS) comparativamente ao controlo. Além disso, a viabilidade celular diminui significativamente na condição de CA + ABT-702 em relação ao CA ($P < 0,05$, Tukey e $P < 0,01$, DMS).

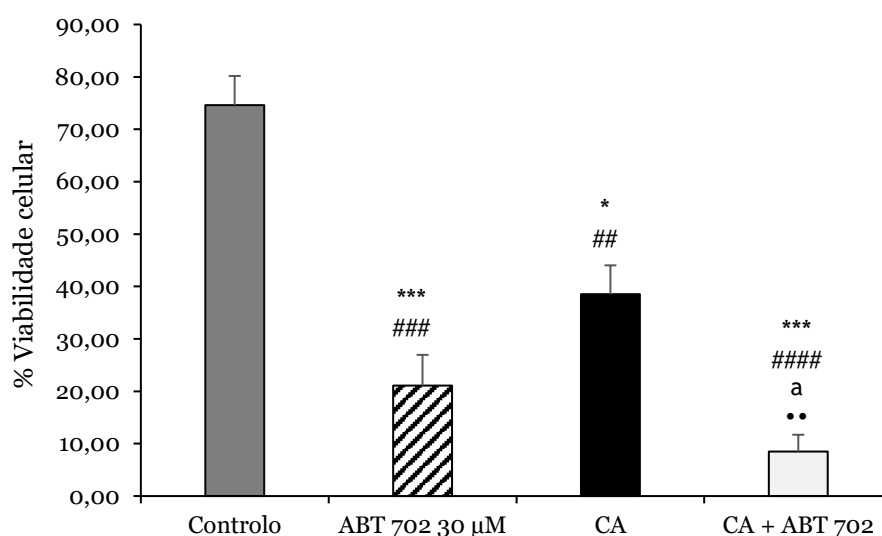


Figura 17. Viabilidade celular de HA nas condições de controlo, ABT-702 30 μ M, CA e CA + ABT-702. As barras representam a média \pm EPM (Erro Padrão da Média) da % de viabilidade/proliferação celular correspondente ao ensaio só com células+meio, $n=3$ (* $P < 0,05$, Tukey; ** $P < 0,01$, DMS; ***,### $P < 0,001$, Tukey e DMS, respetivamente;#### $P < 0,0001$, DMS vs Controlo) (a $P < 0,05$, Tukey; •• $P < 0,01$, DMS vs CA).

Relativamente às linhas celulares U373 (figura 18), U87 (figura 19) e SNB19 (figura 20), em qualquer delas a percentagem de viabilidade celular não apresenta diferenças significativas nas condições de ABT-702 30 μ M nem de CA, no entanto, diminui significativamente na presença de CA + ABT-702 quando comparada com o controlo e diminui significativamente na presença de CA + ABT-702 quando comparada com o CA.

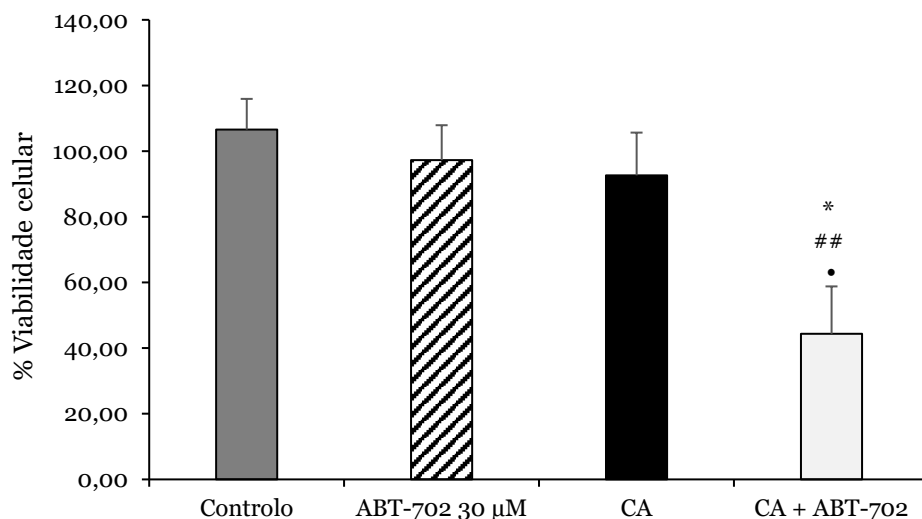


Figura 18. Percentagem de viabilidade celular de U373 nas condições de controlo, ABT-702 30 μ M, CA e CA + ABT-702. As barras de erro representam a média \pm EPM da % de viabilidade/proliferação celular correspondente ao ensaio só com células+meio, n=4 (*P<0,05, Tukey; ##P<0,01, DMS vs Controlo) (*P<0,05, DMS vs CA).

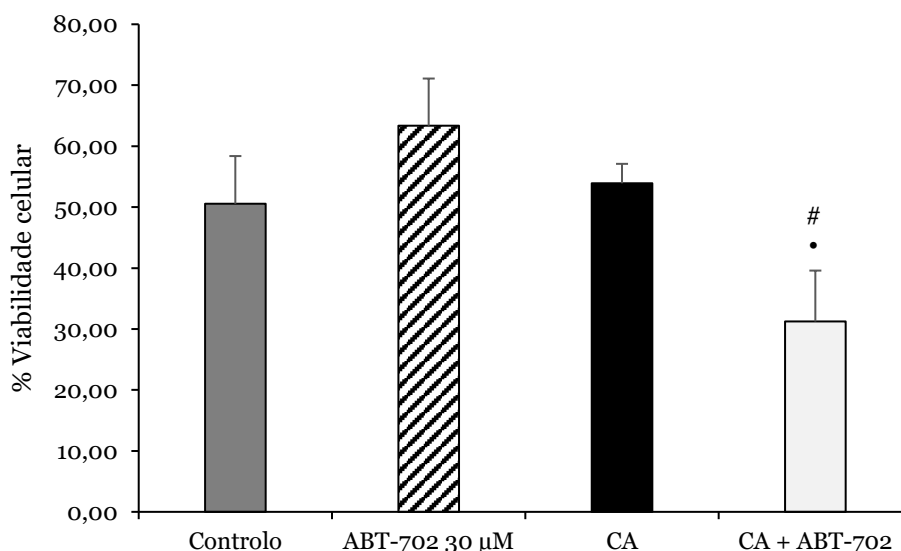


Figura 19. Percentagem de viabilidade celular de U87 nas condições de controlo, ABT-702 30 μ M, CA e CA + ABT-702. As barras de erro representam a média \pm EPM da % de viabilidade/proliferação celular correspondente ao ensaio só com células+meio, n=4 (#P<0,05, DMS vs Controlo) (*P<0,05, DMS vs CA).

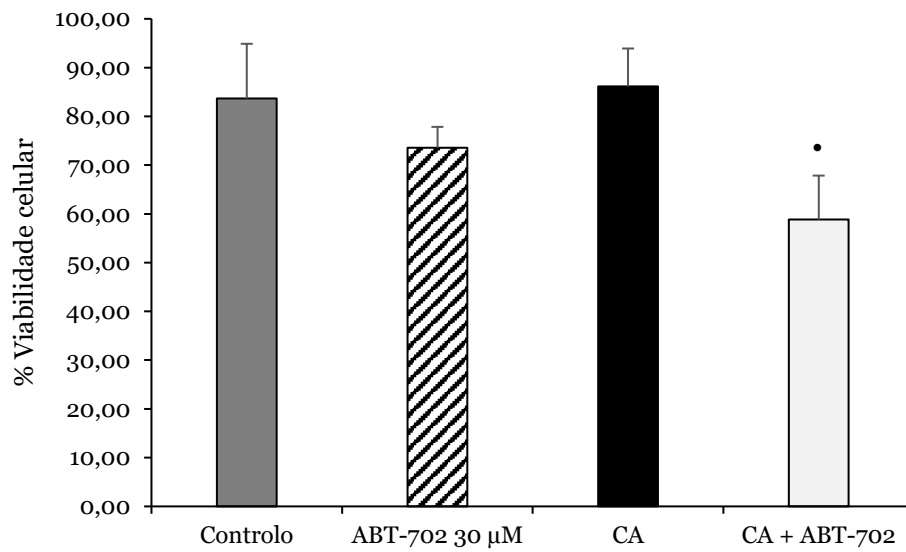


Figura 20. Percentagem de viabilidade celular de SNB19 nas condições de controlo, ABT-702 30 μ M, CA e CA + ABT-702. As barras de erro representam a média \pm EPM da % de viabilidade/proliferação celular correspondente ao ensaio só com células+meio, n=4 (*P<0,05, DMS vs CA).

2. Expressão dos genes do metabolismo da adenosina nas linhas celulares de glioblastoma e nos astrócitos humanos

Para testar se a expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da adenosina se encontra alterada nas linhas celulares de glioblastoma em comparação com o HA, a expressão de mRNAs dessas enzimas foi avaliada por PCR em HA e nas linhas celulares de U87, SNB19 e U373.

2.1. Otimização de *primers*

Os resultados obtidos através da realização do PCR convencional confirmam a expressão dos genes ADK, NT5E, ADA, ENT1, ENT2 e AHCY nas linhas celulares de glioblastoma e nos astrócitos (figura 21). Os produtos de PCR obtidos foram analisados/visualizados após separação por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com *GreenSafe* e em comparação com o marcador de peso molecular, NZY Ladder VI. Foi confirmada a amplificação dos produtos de PCR com o peso molecular esperado. A figura 21A corresponde ao gene da ADK com um tamanho de 129 bp; na figura 21B verifica-se a presença do gene NT5E, com um tamanho de 224 bp; a figura 21C diz respeito ao gene ADA com um tamanho de 127 bp; a figura 21D corresponde ao gene ENT1, com um tamanho de 237 bp; na figura 21E verifica-se a amplificação do fragmento do gene ENT2 com um tamanho de 146 bp e finalmente, na figura 21F, o fragmento corresponde ao gene AHCY, com um tamanho de 208 bp. Nos controlos negativos não se verificou amplificação na mesma banda dos genes de interesse, indicando ausência de contaminação e de amplificação inespecífica dos *primers*. Deste modo, verificou-se a presença dos genes em análise nas linhas celulares de glioblastoma e nos astrócitos.

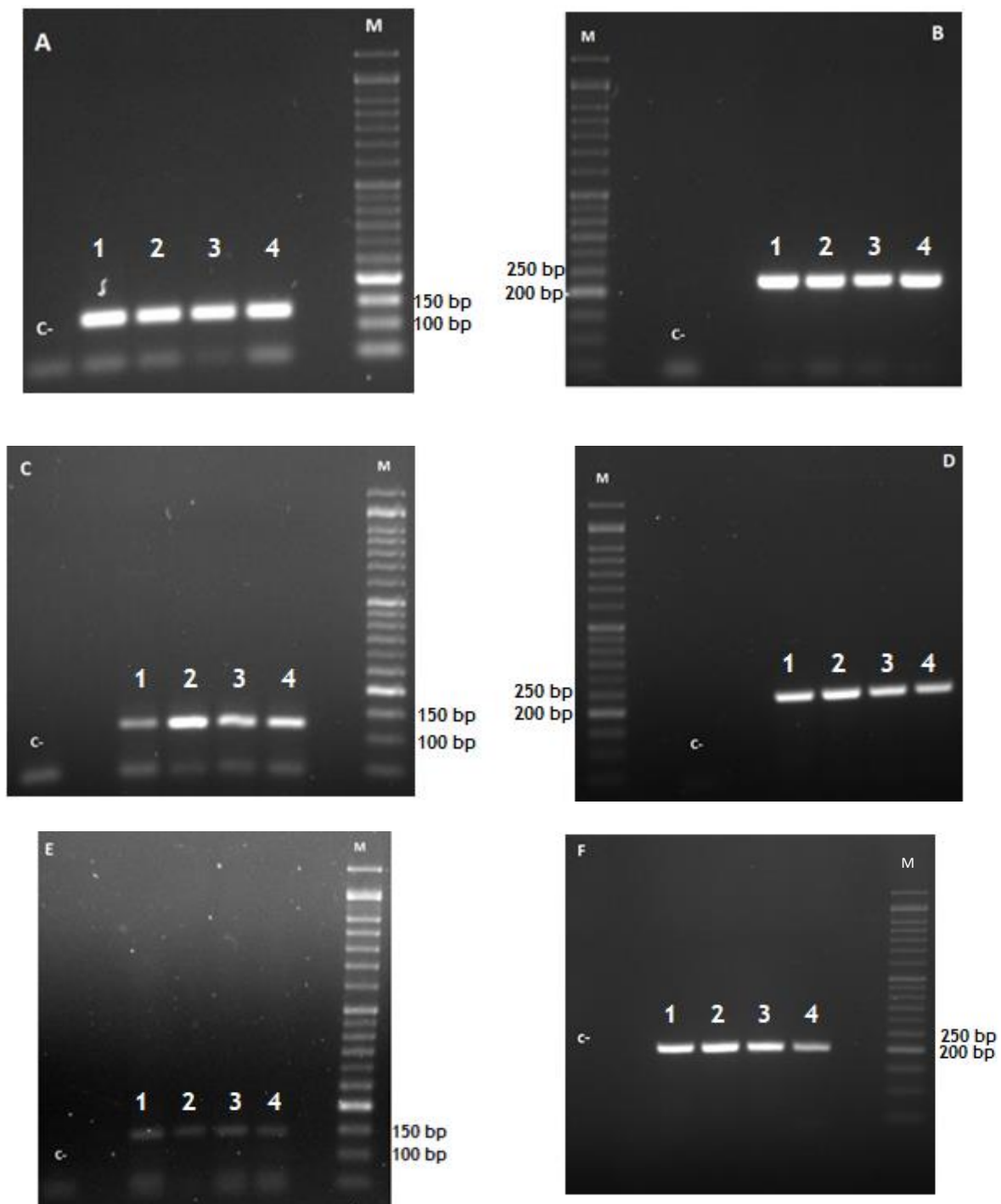


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com *GreenSafe* dos produtos de PCR amplificados, relativos aos genes envolvidos na via metabólica da adenosina. Em cada imagem encontra-se representado o marcador de peso molecular (M), o controlo negativo (C-) e o fragmento relativo a cada gene, em cada tipo de células (1- U87, 2- U373, 3- SNB19 e 4 – HA): A- ADK (129 bp); B- NT5E (224 bp); C – ADA (127 bp); D – ENT1 (237 bp); E – ENT2 (146 bp); F – AHCY (208 bp).

2.2. PCR em Tempo Real

2.2.1. Expressão gênica

A técnica de PCR em tempo real permitiu analisar as diferenças dos níveis de expressão dos seis genes em estudo NT5E, ENT1, ENT2, AHCY, ADK e ADA, nas linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19) e nos astrócitos humanos (HA). Para a normalização dos níveis de expressão dos genes referidos previamente foi utilizado o gene endógeno, β -actina.

2.2.1.1. Comparação da expressão obtida em linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19) com a obtida em HA

Começou-se por comparar a expressão do mRNA dos 6 genes entre os HA (referência) e as linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19), tal como representado nas figuras seguintes: figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27 – NT5E, ENT1, ENT2, AHCY, ADK e ADA, respetivamente.

Comparativamente com os HA, verifica-se que: na linha celular U87, há um aumento significativo da expressão de NT5E ($P < 0,0001$, Tukey e DMS) e de ENT1 ($P < 0,05$, Tukey e DMS) e uma tendência para aumento da ADK ($P < 0,05$, DMS); na linha celular U373 há uma diminuição significativa da expressão de NT5E ($P < 0,05$, Tukey e DMS) e um aumento da expressão de ENT1 ($P < 0,01$, Tukey e DMS), ENT2 ($P < 0,01$, Tukey e $P < 0,001$, DMS) e ADK ($P < 0,05$, Tukey e DMS) e uma tendência para aumento da ADA ($P < 0,05$, DMS); por fim na linha celular SNB19 há também uma diminuição significativa na expressão de NT5E ($P < 0,05$, Tukey e $P < 0,01$, DMS) e um aumento na expressão dos genes ADK ($P < 0,05$, Tukey e DMS) e ADA ($P < 0,05$, Tukey e DMS).

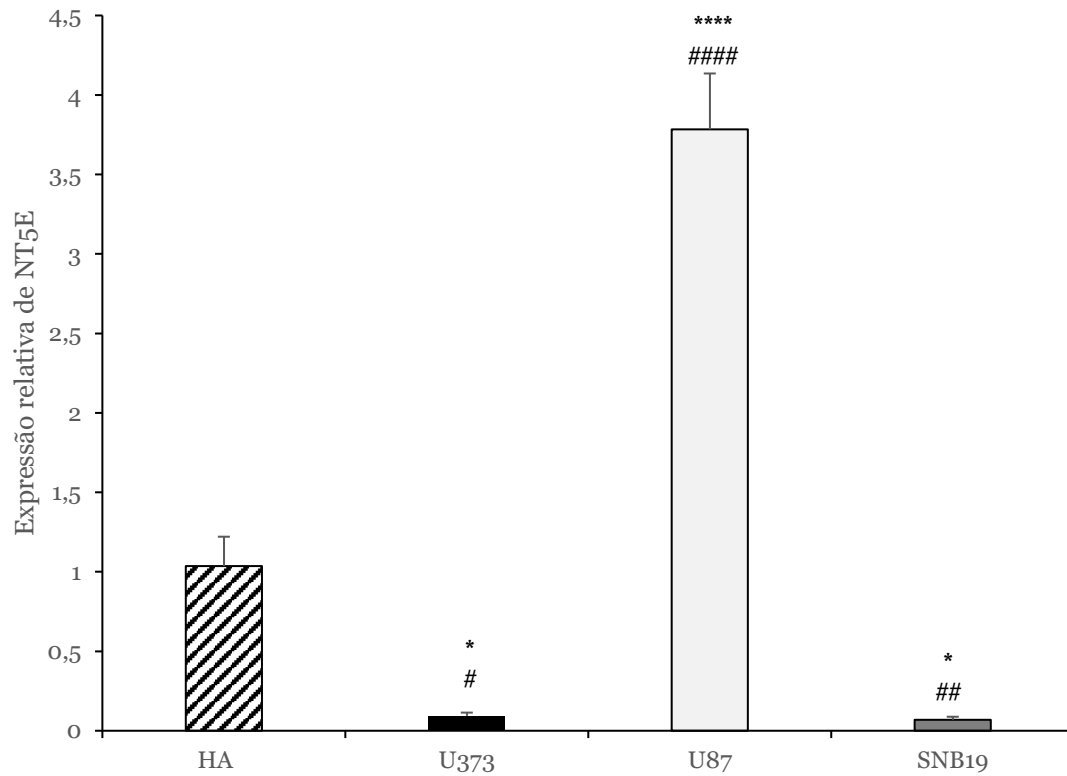


Figura 22. Níveis de expressão do gene NT5E em linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19) vs. astrócitos humanos (HA). As barras representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida nas linhas relativamente à obtida em HA, n=3 (*, #p<0,05, Tukey e DMS, respetivamente; ##P<0,01, DMS e ****, #####P<0,0001, Tukey e DMS, respetivamente vs HA).

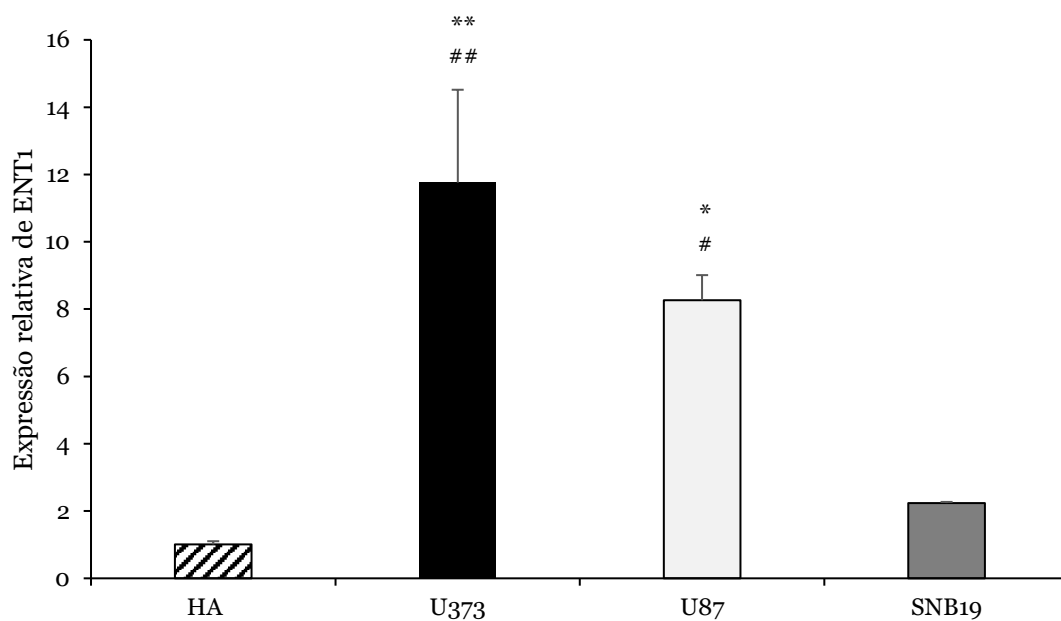


Figura 23 Níveis de expressão do gene ENT1 em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19). As barras representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida nas linhas relativamente à obtida em HA, n=3 (*, #P<0,05, Tukey e DMS, respetivamente; **, ##P<0,01, Tukey e DMS, respetivamente vs HA)

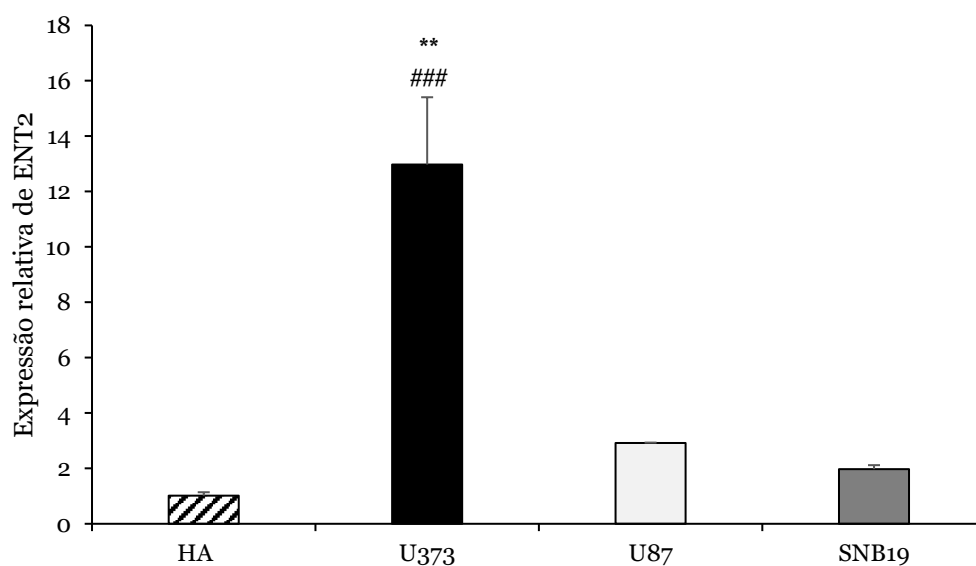


Figura 24. Níveis de expressão do gene ENT2 em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19). As barras representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida nas linhas relativamente à obtida em HA, n=3 (*, #P<0,05, Tukey e DMS, respetivamente; **P<0,01, Tukey e ###P<0,001, DMS vs HA).

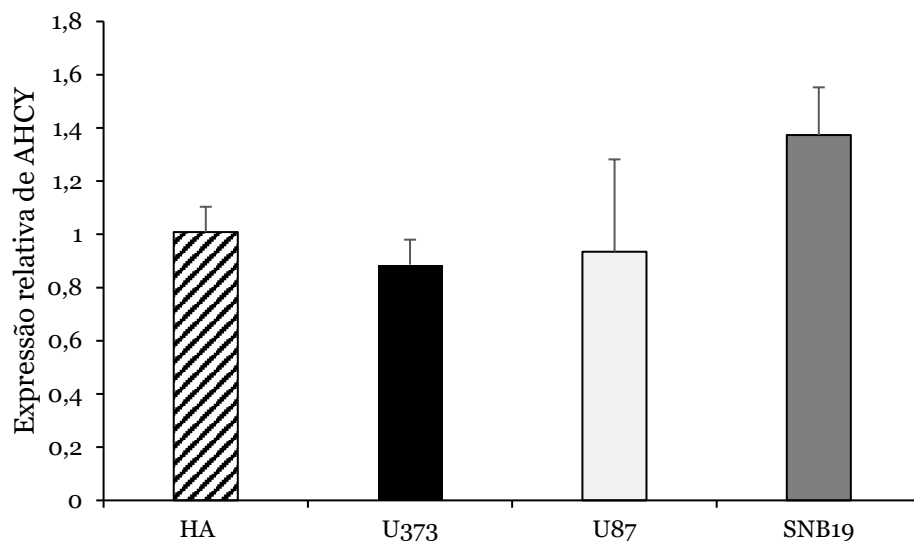


Figura 25. Níveis de expressão do gene AHCY em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19). As barras representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida nas linhas relativamente à obtida em HA, n=3.

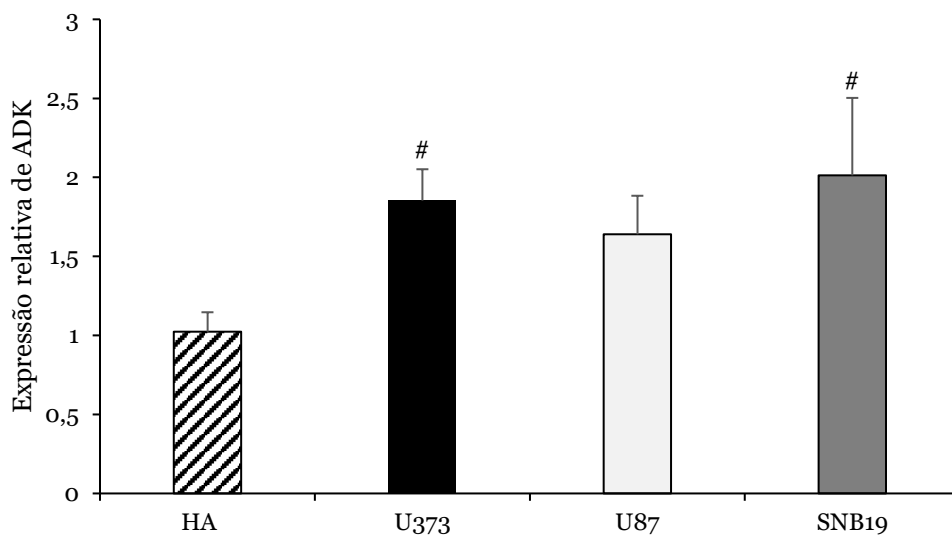


Figura 26. Níveis de expressão do gene ADK em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19). As barras representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida nas linhas relativamente à obtida em HA, n=3 (*P<0,05, DMS vs HA).

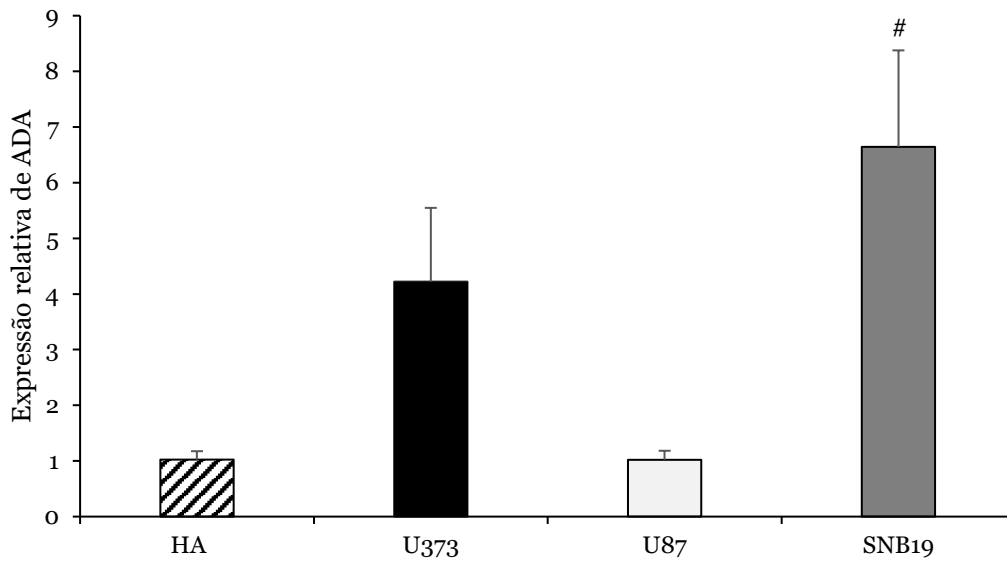


Figura 27. Níveis de expressão do gene ADA em astrócitos humanos (HA) vs. linhas celulares de glioblastoma (U373, U87 e SNB19). As barras representam a média ± EPM da expressão do mRNA obtida nas linhas relativamente à obtida em HA, n=3 (*P<0,05, DMS vs HA).

2.2.1.2. Efeito do aumento da concentração de adenosina na expressão genética

Numa segunda fase, avaliou-se o efeito do aumento da concentração de Ado, por adição de Ado (30 μ M exógena ou por inibição da ADK pelo ABT-702 (15 μ M), na expressão dos seis genes envolvidos no metabolismo da Ado, nos quatro tipos de células (HA, U87, U373 e SNB19).

Na figura 28, encontra-se representada a expressão do gene NT5E, onde se pode observar que, comparativamente com o respetivo controlo, há um aumento na sua expressão em HA, quando estas células foram estimuladas com Ado (P<0,05, DMS) e nas células U373 na presença de ABT-702 (P<0,05, DMS). Contrariamente, na linha celular U87 há uma diminuição significativa da expressão de NT5E na presença de ABT-702 (P<0,05, DMS) comparativamente com o respetivo controlo. Não se observaram diferenças na expressão do gene NT5E, quer na presença de Ado quer de ABT-702, na linha SNB19.

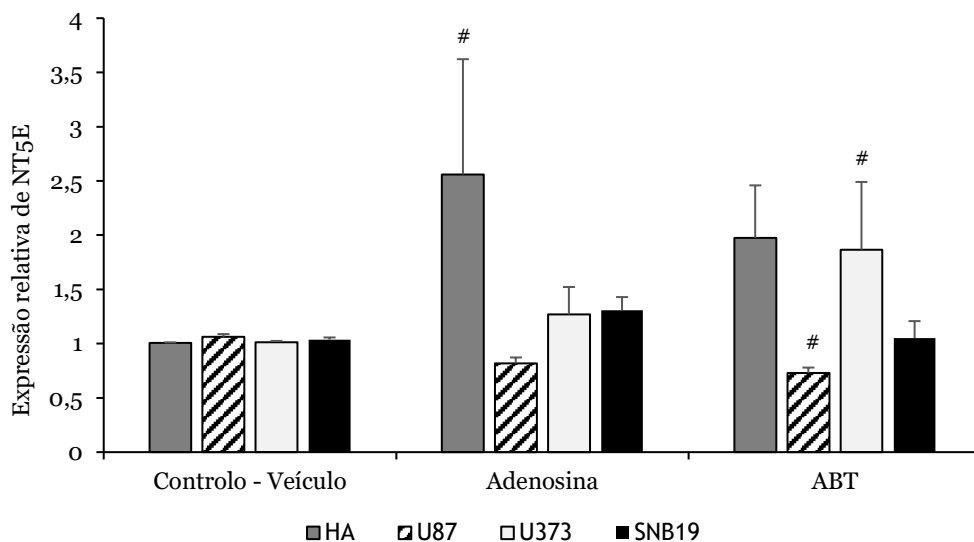


Figura 28. Níveis de expressão do gene NT5E em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M. As barras representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida relativamente à condição controlo, n=3. (#P<0,05, DMS, vs o controlo correspondente ao mesmo tipo de célula).

Na figura 29, encontra-se representada a expressão do gene ENT1, onde se observa que, na linha celular U373, relativamente ao controlo, na presença de ABT-702, há uma diminuição significativa da sua expressão (P<0,01, Tukey e DMS), não se observando alteração da expressão deste gene, quer na presença de Ado quer na presença de ABT-702, em nenhum dos restantes tipos de células.

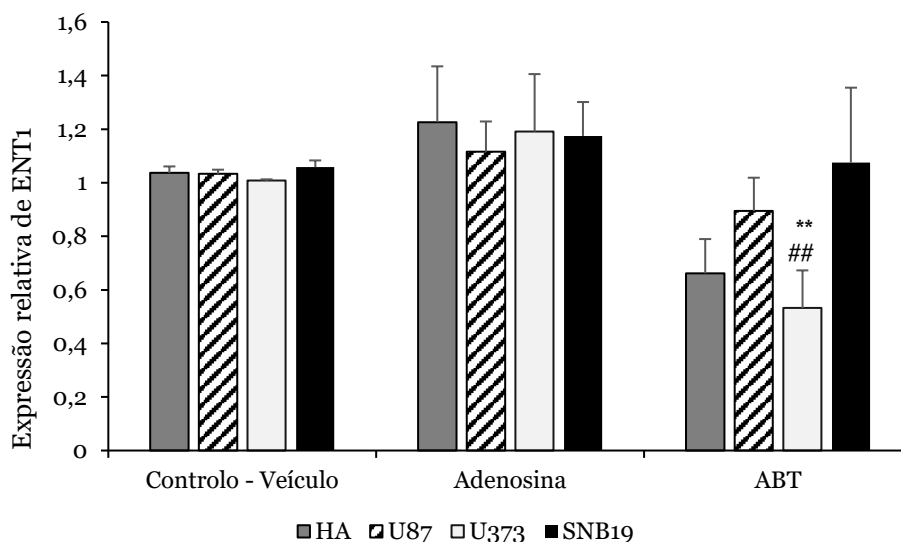


Figura 29. Níveis de expressão do gene ENT1 em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M. As barras de erro representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida relativamente à condição controlo, n=3 (**,##P<0,01, Tukey e DMS, respetivamente vs o controlo correspondente ao mesmo tipo de célula).

Na figura 30, encontra-se representada a expressão do gene ENT2, onde se verifica que: na linha celular U87, há uma diminuição significativa na presença de Ado, comparativamente com o controlo ($p < 0,05$, Tukey; $p < 0,01$, DMS); e em U373, quando comparado com o controlo, há uma diminuição da expressão de ENT2 na presença de Ado ($p < 0,05$, Tukey; $p < 0,01$, DMS) e de ABT-702 ($p < 0,01$, Tukey; $p < 0,001$, DMS). Similarmente, em HA na presença de ABT-702, observa-se uma diminuição da expressão de ENT2 comparativamente ao controlo ($P < 0,05$, DMS).

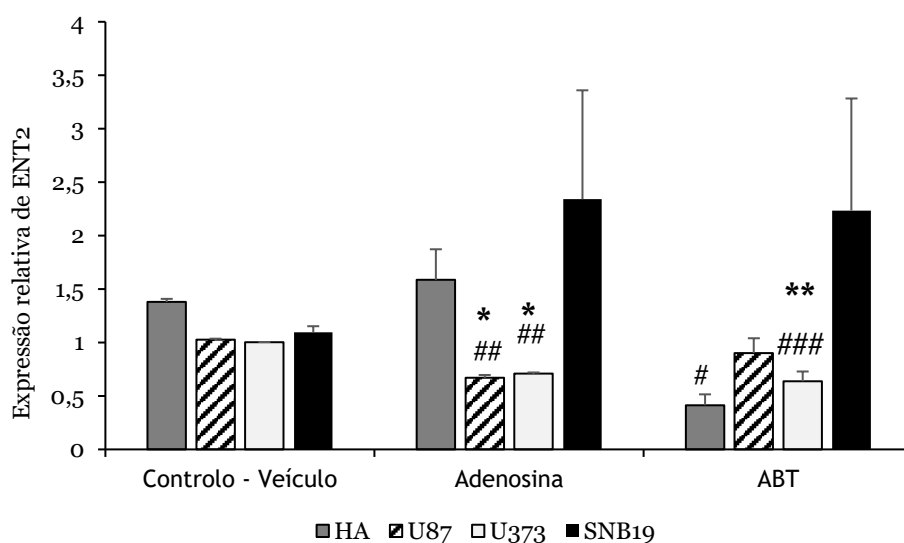


Figura 30. Níveis de expressão do gene ENT2 em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M. As barras representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida relativamente à condição controlo, $n=3$ (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, Tukey; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$, DMS vs o controlo correspondente ao mesmo tipo de célula).

A figura 31 diz respeito ao gene AHCY, onde se pode observar que há um aumento na sua expressão, em HA, na presença de Ado, comparativamente com o controlo, sendo esta diferença significativa ($P < 0,05$, Tukey; $P < 0,01$, DMS), não se observando alteração da expressão do AHCY, tanto na presença de Ado como de ABT-702, relativamente ao controlo, para as restantes células estudadas.

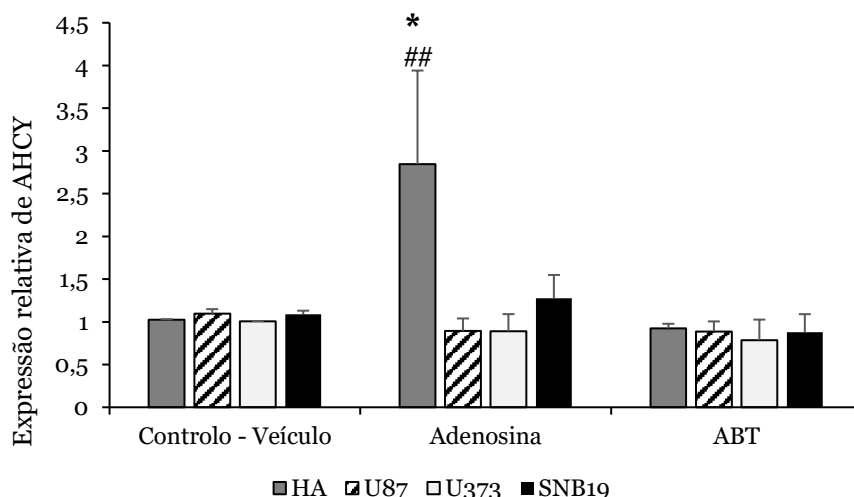


Figura 31. Níveis de expressão do gene AHCY em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M. As barras representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida relativamente à condição controlo, n=3 (* P <0,05, Tukey ## P <0,01, DMS vs o controlo correspondente ao mesmo tipo de célula).

As figuras 32 e 33 representam a expressão dos genes ADK e ADA, respetivamente. Relativamente à ADK, não se observaram diferenças significativas para nenhum tipo das células estudadas. Em relação à ADA, verifica-se um aumento significativo na sua expressão em U87, na condição de Ado comparativamente com o controlo (P <0,05, Tukey e DMS).

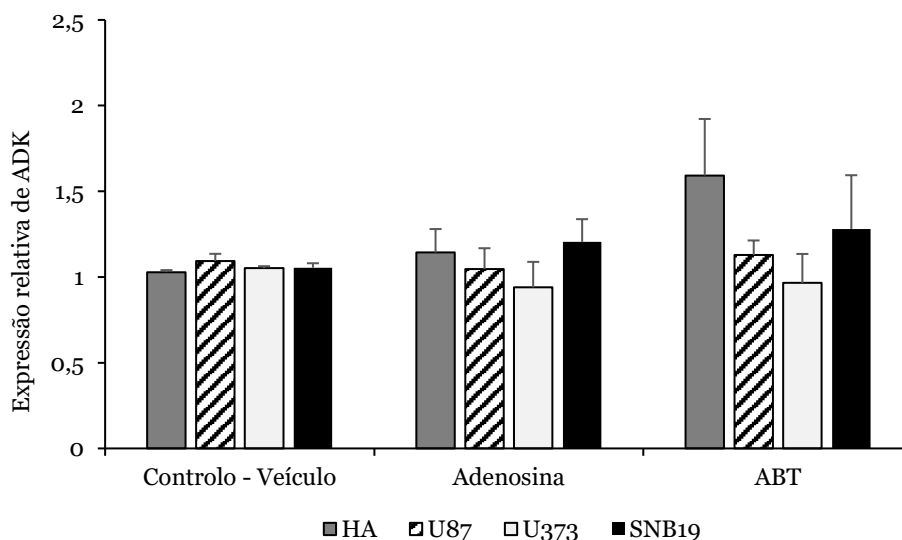


Figura 32. Níveis de expressão do gene ADK em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M. As barras representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida relativamente à condição controlo, n=3.

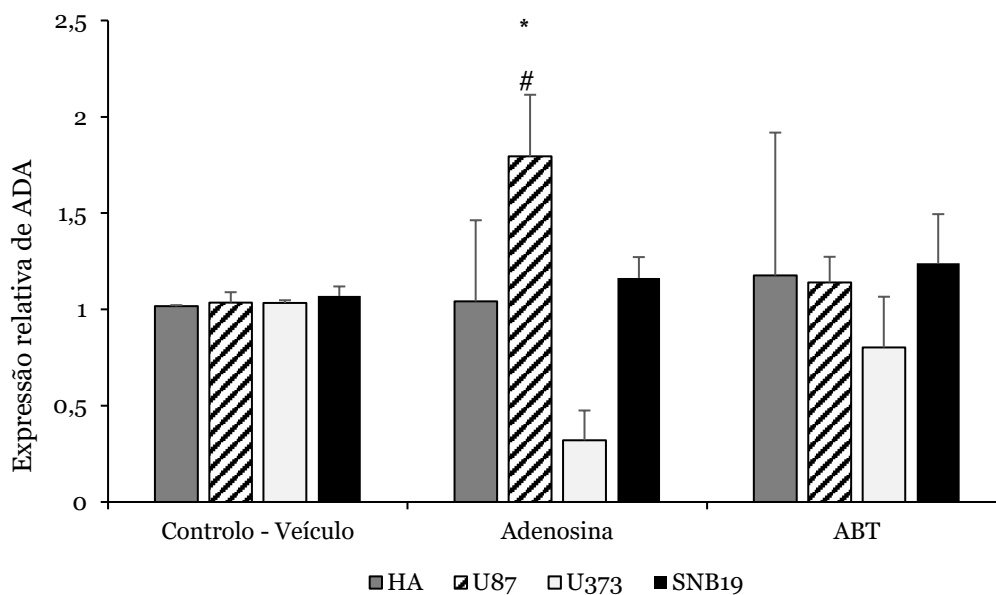


Figura 33. Níveis de expressão do gene ADA em astrócitos humanos (HA) e em linhas celulares de glioblastoma (U87, U373 e SNB19), nas condições de controlo, Ado 30 μ M e ABT-702 15 μ M. As barras representam a média \pm EPM da expressão do mRNA obtida relativamente à condição controlo, n=3 3 (*.#P<0,05, Tukey e DMS, respetivamente vs o controlo correspondente ao mesmo tipo de célula)..

2.2.1.3. Papel dos recetores da Ado na mediação dos efeitos do aumento da concentração de adenosina na expressão genética

Para testar se o efeito do aumento da concentração de adenosina na expressão dos genes do metabolismo desta, seria mediado via recetor, foi-se averiguar se nos genes em que o aumento da concentração de Ado alterou a expressão desses genes, essa alteração era modificada na presença do cocktail de antagonistas dos recetores da Ado (CA). Para tal realizaram-se 4 ensaios: controlo-veículo, CA, CA na presença de Ado e também CA na presença de ABT-702.

A figura 34 corresponde à linha celular U373 e aos genes NT5E, ENT1 e ENT2. Observou-se que, para o gene NT5E, houve um aumento significativo da sua expressão na presença de CA + ABT-702, comparativamente com o controlo ($P < 0,001$, Tukey e DMS) e também comparando CA + ABT-702 com o CA ($P < 0,0001$, Tukey e DMS), indicando que o efeito do ABT-702 não seria mediado via recetor da Ado. Relativamente aos genes ENT1 e ENT2, verifica-se que há uma diminuição na sua expressão relativamente ao controlo, na

presença de CA ($P < 0,0001$, Tukey e DMS), de CA + Ado ($P < 0,0001$ e $P < 0,001$, respetivamente) e também de CA + ABT-702 ($P < 0,0001$, Tukey e DMS), no entanto a expressão destes genes na presença de CA + Ado ou CA + ABT-702 não difere da expressão destes genes na presença de CA, sugerindo que o efeito inibitório do aumento de Ado na expressão dos genes ENT1 e ENT2, observado nas figuras 29 e 30, será mediado via recetores da Ado. O facto de o CA sozinho diminuir a expressão dos genes ENT1 e ENT2, sugere que adenosina endógena basal tenderia a aumentar a expressão destes genes por ativação dos seus recetores, provavelmente via recetores A1 e A2A os quais apresentam elevada afinidade para a Ado. Deste modo, quando os recetores da Ado são bloqueados pelo CA, a expressão dos ENT1 e do ENT2 tenderá a diminuir.

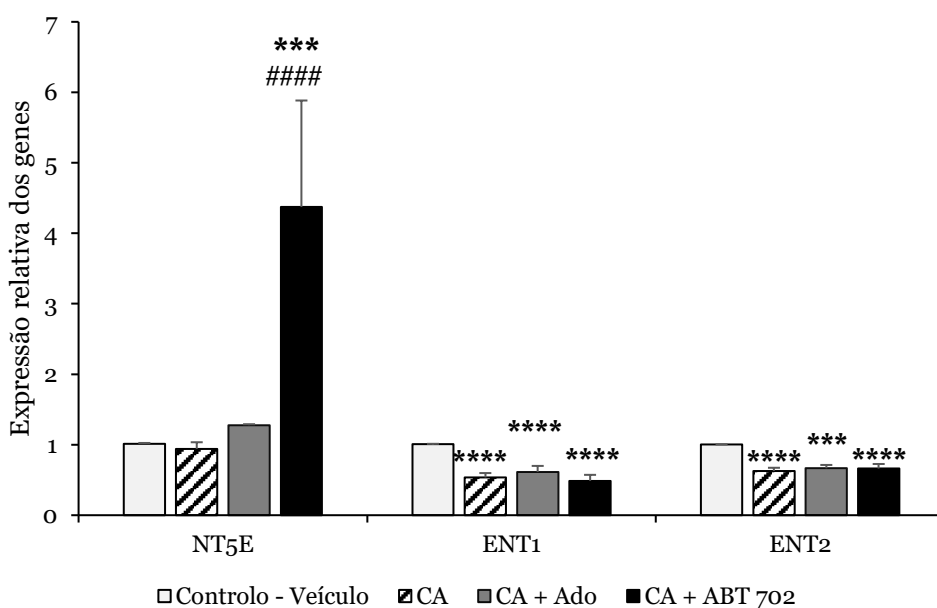


Figura 34. Níveis de expressão dos genes NT5E, ENT1 e ENT2 na linha celular de glioblastoma U373, nas condições de Cocktail de Antagonistas (CA), CA + Ado e CA + ABT-702. As barras representam a média \pm EPM, $n=3$, da expressão do mRNA obtida relativamente à condição controlo. (* - quando comparado com o controlo - veículo; # - quando comparado com o CA) (** $P < 0,001$, ANOVA seguida de testes post-hoc Tukey e DMS; ***,### $P < 0,0001$, ANOVA seguida de testes post-hoc Tukey e DMS).

Na figura 35 encontra-se representada a expressão dos genes NT5E, ENT2 e ADA, na linha celular U87. Neste caso, observa-se que há um aumento da expressão de NT5E na presença de CA + ABT-702, quando comparado com o controlo ($P < 0,05$, Tukey e DMS) e com o CA ($P < 0,05$, Tukey e DMS), indicando que o efeito do ABT-702 não será mediado via recetor da Ado. Curiosamente, este efeito do ABT-702, contrasta com o efeito inibitório deste na expressão da NT5E observado na ausência de CA (figura 28). Uma explicação para esta discrepância poder-se-á dever a que, nas células U87, o ABT-702 produza um efeito inibitório na expressão da NT5E via ativação dos recetores da Ado e um efeito excitatório na expressão desses genes por um mecanismo independente dos recetores da Ado, o qual só se tornará evidente quando os recetores da Ado são bloqueados na presença do CA.

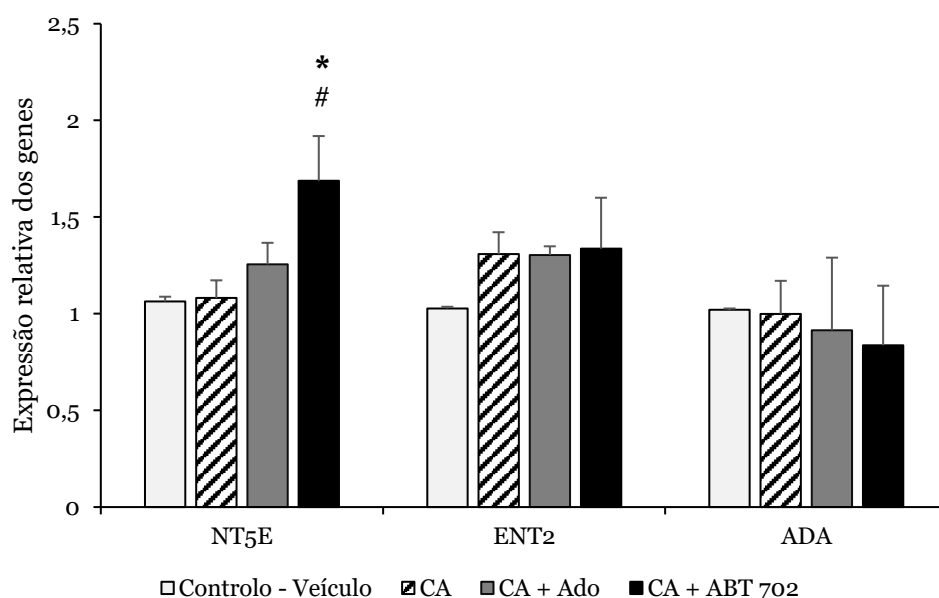


Figura 35. Níveis de expressão dos genes NT5E, ENT2 e ADA na linha celular de glioblastoma U87, nas condições de Cocktail de Antagonistas (CA), CA + Ado e CA + ABT-702. As barras representam a média \pm EPM, $n=3$, da expressão do mRNA obtida relativamente à condição controlo. (* - quando comparado com o controlo - veículo; # - quando comparado com o CA) (*, # $P < 0,05$, ANOVA seguida de testes post-hoc Tukey e DMS).

V. Discussão

O glioblastoma é um tipo de tumor do grau IV, muito agressivo e caracterizado pelo seu crescimento infiltrativo. A falta de oxigenação, conhecida por hipóxia, promove a invasão das células tumorais nas células saudáveis do cérebro (mecanismo de escape).¹⁴ Nestas condições ocorre um aumento da concentração de adenosina, sendo este considerado um mecanismo de proteção endógena. Uma vez que este nucleósido possui uma variedade de funções, como a estimulação do crescimento tumoral, angiogénese e supressão das respostas imunes⁷³, é importante perceber de que forma é formado e degradado nas células tumorais de glioblastoma e comparar com as células saudáveis. Assim, é crucial saber se as enzimas envolvidas no metabolismo da adenosina estão alteradas nas células tumorais de glioblastoma, quando comparadas com os astrócitos humanos.

Deste modo, foram selecionados 3 tipos de linhas celulares de glioblastoma – U373, U87 e SNB19, todas com morfologias e características diferentes e comparadas com astrócitos humanos normais. Começou-se por avaliar o efeito do aumento da concentração de Ado na viabilidade/proliferação nestes tipos de células, recorrendo aos ensaios de MTT, observou-se que nas células de HA, há uma diminuição significativa da viabilidade celular na presença de Ado, CA e CA + Ado, comparativamente com o controlo. Assim, parece indicar que a adição de Ado exógena diminui a proliferação/viabilidade celular em HA e esse efeito não é prevenido pela presença do CA, sugerindo que o efeito da Ado não é mediado via recetor. Deste modo, os resultados parecem indicar que há outros mecanismos envolvidos no efeito da Ado, como a inversão da reação catalisada pela hidrolase da SAH, com acumulação de SAH e inibição das metiltransferases.⁶²

Ao contrário do observado em HA, a adição de Ado exógena não afetou a viabilidade/proliferação celular em nenhuma das linhas celulares de GBM estudadas, quer na ausência quer na presença de CA. No entanto observou-se diminuição da viabilidade/proliferação celular produzida pelo CA nas linhas U373 e SNB19, o que sugere que a Ado endógena em condições basais poderá estar a exercer um efeito protetor nestas células via ativação dos recetores da Ado, efeito protetor esse que é bloqueado pela presença do CA.

Posteriormente, foi avaliada a viabilidade celular de HA e das linhas celulares (U373, U87 e SNB19) quando a concentração de Ado endógena era aumentada por inibição da ADK pelo ABT-702. Foram realizados os ensaios na presença de ABT-702, de CA e de CA + ABT-702. Relativamente aos HA observou-se que, quando comparado com o controlo, há uma diminuição da viabilidade celular: na presença de ABT-702, de CA e de CA + ABT-702. Quando comparado com o CA, as células estimuladas com CA + ABT-702 também sofreram uma diminuição na viabilidade celular significativa. Tendo em conta que o ABT-702 é um inibidor da ADK – a principal enzima responsável pela remoção da Ado nos HA e nas

células de GBM —, este irá aumentar a Ado intracelular, reduzindo assim a proliferação celular. Quando o ABT-702 se encontra na presença de um CA, o efeito do ABT não é prevenido, indicando um efeito independente dos recetores da Ado. Relativamente às linhas celulares (U373, U87 e SNB19) observou-se que há uma diminuição significativa da viabilidade produzida pelo ABT-702, apenas na presença de CA. A não observação de efeito do ABT-702 na ausência de CA, sugere que a adenosina basal endógena poderá estar a exercer um efeito protetor nestas células via ativação dos recetores da Ado, impedindo assim o efeito inibitório do ABT-702 na proliferação/viabilidade celular.

Em conclusão, os resultados sugerem que, contrariamente ao observado em HA onde a adição de adenosina exógena produziu um efeito inibitório na proliferação/viabilidade celular, a ausência de efeito da adenosina exógena nas linhas de glioblastoma poderá dever-se a um aumento na remoção de adenosina pela ADK; portanto, quando a remoção da adenosina pelo ADK é impedida – inibindo a ADK com o ABT-702 - o aumento da concentração de adenosina é capaz de produzir o seu efeito inibitório na proliferação/viabilidade celular nas linhas de GBM. Uma vez que estes resultados sugerem que a ADK poderá estar aumentada nas linhas de GBM comparativamente aos HA, a expressão desta, bem como de outras enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo da Ado, foi investigada nos diferentes tipos de células.

Posteriormente foram selecionadas 6 enzimas e transportadores envolvidos no metabolismo da Ado – NT5E, ENT1, ENT2, AHCY, ADK e ADA e analisou-se a expressão destas enzimas e transportadores, utilizando o PCR em tempo real. Primeiramente, foi feita uma comparação dos HA com as linhas celulares (U373, U87 e SNB19). Em relação ao gene NT5E observou-se uma diminuição na sua expressão nas linhas U373 e SNB19, comparativamente com os HA e um aumento significativo da sua expressão na linha celular U87 (versus HA), também verificado pelo estudo realizado por Jiao Wang, 2019, que verificou que em tecidos de glioblastoma a expressão deste gene se encontrava elevada.⁷⁴ Assim, parece haver uma diminuição da produção extracelular de Ado nas linhas celulares U373 e SNB19, enquanto que há um aumento da mesma na linha celular U87, comparativamente com HA. Relativamente à expressão do gene ENT1 observou-se um aumento nas linhas celulares U373 e U87 comparativamente com HA, podendo indicar que o transporte de Ado — mais concretamente a captação, pois o gradiente de concentrações de Ado nestas células favorece a entrada⁴⁸ —se encontra muito ativo nestas células. O aumento da captação da Ado nas linhas celulares U373 e U87 sugere que a Ado poderá conferir alguma vantagem a estas células, por exemplo para a síntese de purinas após fosforilação da Ado a AMP pela ADK. A expressão do gene ENT2 também aumenta significativamente em U373 (versus HA). Comparativamente aos HA, a expressão do gene

ADK aumenta significativamente nas linhas celulares U373 e SNB19 e parece haver uma tendência para um aumento na linha U87, indicando que, nestas células, a degradação da Ado a AMP se encontra elevada. Relativamente à expressão do gene ADA, aumenta significativamente em SNB19 quando comparada com HA, o que indica que nesta linha celular a degradação da Ado a inosina também se encontra elevada. De facto, num estudo realizado por Huang et al., 2015, foi verificado que a ADK e a ADA se encontra sobreexpressa em pacientes com gliomas de nível II-IV.⁷⁵ O aumento da expressão da ADK relativamente aos HA, nas linhas U373 e SNB19 — e possivelmente também na U87 — explica a razão pela qual a adição de Ado exógena não modificou a sobrevivência/proliferação celular nas linhas de GBM, ao contrário dos HA em que houve uma diminuição dessa sobrevivência/proliferação celular, uma vez que a Ado seria mais rapidamente removida nas linhas do que nos HA. Estes resultados também explicam porque o ABT-702, contrariamente à Ado exógena, produziu uma diminuição dessa sobrevivência/proliferação celular tanto nas linhas como nos HA, pois ao inibir a remoção da Ado pela ADK permitirá que a Ado endógena acumule e iniba a proliferação/viabilidade celular. Sendo assim, o aumento da expressão da ADK, e da ADA no caso da linha SNB19, poderá constituir um mecanismo de adaptação tumoral face ao efeito inibitório na proliferação celular produzido pelos elevados níveis de Ado que se encontram no microambiente tumoral, impedindo que a Ado intracelular se acumule.

Finalmente foi investigada como a expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da Ado era modificada por aumento da concentração de Ado, tanto em HA como nas 3 linhas de GBM estudadas. Para tal foram definidas 3 condições – controlo-veículo, Ado e ABT-702.

A expressão do gene NT5E nos HA e na linha celular U373 (versus controlo) aumenta significativamente quando estas células são estimuladas com Ado exógena ou quando a adenosina endógena é aumentada pelo inibidor da ADK, o ABT-702, respetivamente. Como a maior parte da Ado em HA e em células de GBM provém da hidrólise extracelular de nucleótidos por ação de ectonucleotidases, onde, além da CD39 (produto do gene NT5E) se inclui também a CD73, que catalisa a hidrólise sequencial do ATP a AMP, o aumento da expressão do NT5E em condições de elevada concentrações de adenosina, em HA e células U373, poderá constituir uma reação da célula de forma a aumentar a remoção dos nucleótidos extracelulares. Para testar a validade desta hipótese dever-se-ia avaliar também o efeito do aumento da concentração de Ado na expressão do gene da CD39. Em contraste com os HA e a linha U373, a expressão do NT5E diminuiu quando comparada com o controlo na linha U87.

O gene ENT1 sofre uma diminuição significativa na linha celular U373 (versus controlo) quando estas são estimuladas com ABT-702. Também a expressão do gene ENT2, nas linhas celulares U87 e U373 (versus controlo) diminui significativamente quando estas são estimuladas com Ado. Há também uma diminuição na sua expressão em U373 (versus controlo) quando estas células são estimuladas com ABT-702. O facto do aumento da concentração de Ado, por adição de Ado endógena ou pelo ABT-702, promover uma diminuição dos transportadores ENT1 e/ou ENT2 nas células U373 e U87, poderá constituir um mecanismo que contrarie a entrada excessiva de Ado extracelular para o interior da célula e acumulação de Ado intracelular, onde poderia inibir a proliferação/viabilidade celular.

Relativamente ao gene AHCY, observou-se, nos HA, um aumento da sua expressão relativamente ao controlo, quando estes são estimulados com Ado. Não se observou alteração da expressão quer da ADA quer da ADK, relativamente ao controlo, por aumento da concentração de Ado em nenhuma das células estudadas.

Nos genes em que o aumento da concentração de Ado alterou a expressão dos genes do metabolismo desta, foi-se avaliar se esse efeito seria mediado via recetor. Para tal averiguou-se se essa alteração era modificada na presença do cocktail de antagonistas dos recetores da Ado (CA), uma vez que o CA se liga aos recetores da Ado sem os ativar, impedindo que a Ado se ligue aos mesmos e consequentemente inibe o seu efeito. Para tal realizaram-se 4 ensaios: controlo-veículo, CA, CA na presença de Ado e também CA na presença de ABT-702.

A expressão do gene NT5E nas linhas celulares U373 e U87 (versus controlo) aumenta significativamente quando estas células são estimuladas com a CA + ABT-702; quando comparadas com o CA, também se verifica um aumento significativo na sua expressão na presença de CA + ABT-702, indicando um efeito não mediado por recetor. Curiosamente, o efeito excitatório do ABT-702 na expressão do NT5E observado na presença de CA nas células U87, contrasta com o efeito inibitório deste na expressão da NT5E observado na ausência de CA. Uma explicação para esta discrepância poder-se-á dever a que, nas células U87, o ABT-702 produza um efeito inibitório na expressão da NT5E via ativação dos recetores da Ado e um efeito excitatório na expressão desses genes por um mecanismo independente dos recetores da Ado, o qual só se tornará evidente quando os recetores da Ado são bloqueados na presença do CA.

Relativamente à expressão quer do gene ENT1 quer do ENT2, na linha celular U373, quando comparado com o controlo, a sua expressão diminui na presença do CA, do CA + Ado e do CA + ABT-702. No entanto a expressão destes genes na presença de CA + Ado ou

CA + ABT-702 não difere da expressão destes genes na presença de CA, sugerindo que o efeito inibitório do aumento de Ado na expressão dos genes ENT1 e ENT1, observado na ausência de CA, será mediado via recetores da Ado.

VI. Conclusão e Perspetivas futuras

As principais conclusões que se podem retirar dos resultados obtidos neste trabalho são:

- Em astrócitos humanos, pelo menos quando os recetores da Ado são bloqueados na presença do cocktail de antagonistas, a adição de Ado exógena diminuiu a viabilidade/proliferação celular, o que não acontece em nenhuma das linhas celulares de GBM estudadas, quer na ausência quer na presença de CA. No entanto, quando a Ado endógena é aumentada inibindo a sua remoção pela ADK com o ABT-702, observa-se uma diminuição da proliferação celular tanto nos astrócitos como nas 3 linhas de GBM estudadas. De um modo geral, na presença de um CA observa-se notoriamente uma maior redução da proliferação celular do que a Ado ou o ABT-702 individualmente, indicando que a possibilidade do efeito da Ado ser independente de recetor;
- Quando comparados os HA com as linhas celulares, observa-se que as três linhas se comportam de formas muito diferentes: em U373, a formação de Ado (pela NT5E) está diminuída, enquanto que o seu transporte (pelos ENTs) e a sua degradação (pela ADK) é favorecida (versus HA); em U87 a formação de Ado (pela NT5E) é favorecida, assim como o seu transporte (através do ENT1); nas SNB19 há também uma diminuição da produção de Ado (NT5E) e um aumento da sua degradação (pelas enzimas, ADK e ADA).
- Assim, considerando o mencionado anteriormente, pode-se inferir que as linhas celulares, principalmente as U373 e as SNB19, favorecem a ação das enzimas que degradam a Ado, sendo este um possível mecanismo de escape que estas células possuem para que este nucleósido não possa exercer os seus efeitos anti proliferativos.
- Sob condições de concentrações de Ado elevadas, há uma tendência para ocorrer uma inibição do transporte da mesma, nas linhas celulares U87 e U373, pelo ENT2. Nos HA e na linha U373 há tendência para um aumento, enquanto na linha U87 para uma diminuição, da formação de Ado pela NT5E sob condições de concentrações de Ado aumentadas.

Como conclusão geral, pode-se afirmar que as diferentes linhas de GBM estudadas partilham alguns mecanismos comum de adaptação às concentrações elevadas de Ado, encontradas normalmente no microambiente tumoral, comparativamente aos astrócitos, nomeadamente através do aumento da expressão das enzimas que catalisam a sua remoção, particularmente a ADK, o que lhes permitirá escapar ao efeito inibitório da Ado na proliferação celular. No entanto, no que diz respeito a outras enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo da Ado, como a NT5E, ENT1, ENT2 e AHCY, as diferentes linhas apresentam alterações diferentes entre si, quando comparadas com os astrócitos, o que sugere que existe uma diversidade de mecanismos adaptativos envolvendo a formação,

captação ou utilização da Ado nas diferentes linhas de GBM, comparativamente a astrócitos normais, que de alguma forma lhes possa conferir vantagens de sobrevivência. Futuramente, seria interessante avaliar a atividade enzimática das enzimas estudadas para entender melhor de que forma estas estão a atuar, uma vez que as células apresentam diferentes expressões das mesmas e também complementar os métodos de qPCR com o Western blot como uma forma de confirmar por outro método a expressão das enzimas estudadas.

VII. Referências Bibliográficas

1. Lovinger, D. M. (2008) Communication Networks in the Brain: Neurons, Receptors, Neurotransmitters and Alcohol. *Alcohol Res. Health*, 31 (3), 196–214.
2. Allen, N. J. e Barres, B. A. (2009) Glia - More than just brain glue. *Nature*, 457: 675–677.
3. Hansen, D. V, Hanson, J. E. e Sheng, M. (2018) Microglia in Alzheimer ' s disease. *J. Cell Biol.* 217 (2): 459-472.
4. Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M. e Kettenmann, H. (2017) Microglia in Physiology and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 79: 619–643.
5. Tognatta, R. e Miller, R. H. (2016) Contribution of the oligodendrocyte lineage to CNS repair and neurodegenerative pathologies. *Neuropharmacol.* 110: 539-547
6. Vidovic, D., et al (2018) Transcriptional regulation of ependymal cell maturation within the postnatal brain. *Neural Dev.* 13 (2): 1–9.
7. Wang, D. D. e Bordey, A. (2008) The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol.* 86 (4): 342-367.
8. Malatesta, P. et al. (2003) Neuronal or Glial Progeny : Regional Differences in Radial Glia Fate. 37, 751–764.
9. Luca, Q., Rampazzo, E., Basso, G. e Viola, G. (2012), Glioblastoma cancer stem cells : Role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem. Pharmacol.* 1–11.
10. Perry, A. e Wesseling, P. (2016) Histologic classification of gliomas, in Berger, M. S. and Weller, M. (eds.), *Gliomas*. Ed Aminoff, M. J., Boller, F. and Swaab, D. F. Amsterdam: Elsevier B. V. 71-95 (*Handb. Clin. Neurol.* vol. 134)
11. Chen, R., et al. (2017) Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. - *Neurotherapeutics* 14: 284–297.
12. Louis, D. N. et al. (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 114 (2): 97-109.
13. Zamora-Sánchez, C. J. et al. (2018) Allopregnanolone Alters the Gene Expression Profile of Human Glioblastoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 1–16.
14. Urbańska, K., et al. (2014) Glioblastoma multiforme – an overview. *Contemp. Oncol.* 18 (5): 307-312
15. Plate, K. H. (1999) Mechanisms of Angiogenesis in the Brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58 (4): 313-320.

16. Brat, D. J. e Meir, E. G. V.(2004) Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia , necrosis , and accelerated growth in glioblastoma. *Lab. Invest.* 84: 397–405.
17. Brat, D. J. (2012) Glioblastoma: Biology, Genetics, and Behavior, in Govindan, R. (ed.), American Society of Clinical Oncology, Chicago; pp 102–107.
18. Monteiro, A. R. et al. (2017) The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells*, 1-24
19. Robert, M. C. e Wastie, M. C. (2007) Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases. *Biomed. Imaging Interv.* 4 (1): 1-4
20. Wang, P. F. et al. (2017) Preoperative inflammation markers and IDH mutation status predict glioblastoma patient survival. *Oncotarget* 8 (30), 50117–50123.
21. Su, Y. T., Phan, F. P. e Wu, J. (2018) Perspectives on IDH Mutation in Diffuse Gliomas. *Trends in Cancer* 4 (9), 605–607.
22. Louis, D. N. et al. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary. *Acta Neuropathol.* 131 (6): 803-820
23. Komori, T. (2017) The 2016 WHO Classification of Nervous System : The Major Points of Revision. *Neurol. Med. Chri.* 57 (7): 301-311.
24. Wilhelmsson, U., et al. (2003) Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene* 22: 3407-3411
25. Quezada, C. et al. (2013) 5'-ectonucleotidase Mediates Multiple-Drug Resistance in Glioblastoma Multiforme Cells. *J. Cell. Physiol.* 228: 602–609.
26. Westphal, M. e Lamszus, K. (2011) The neurobiology of gliomas : from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat. Rev. Neurosci.* 12 (9), 495–508.
27. Bowser, J. L., et al. (2017) The Hypoxia-Adenosine Link during Inflammation. *J. Appl. Physiol.* 123 (5): 1303-1320.
28. Motaln, H., et al. (2015) Heterogeneous glioblastoma cell cross-talk promotes phenotype alterations and enhanced drug resistance. *Oncotarget* 6 (38): 40998-41017.
29. Welch, W. C. et al. (1995) Morphologic, immunologic, biochemical and cytogenetic characteristics of the human glioblastoma-derived cell line, SNB-19. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.* 31: 610–616.

30. Urbańska, K. e Mandal, C. C. (2014) Advanced Views of Glioblastoma Multiforme U-87 Cells for Therapy of Brain Tumor. *Int. J.Clin. Biochem. Res.* 1 (1), 59–66.
31. Sachdeva, S. e Gupta, M. (2013) Adenosine and its receptors as therapeutic targets : An overview. *Saudi Pharm. J.* 21: 245–253.
32. Saitoh, M., et al. (2004) Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase. *67: 2005–2011.*
33. Spychala, J. (2000) Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Therapeut.* 87: 161–173.
34. Beavis, P. A., et al. (2012) CD73 : a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol.* 33 (5): 231–237.
35. Fredholm, B. B., (2011) et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXXI . Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors — An Update. *Pharmacol. Rev.* 63 (1): 1–34.
36. Pak, M. A. e Yetkin, Y. (2014) The Sources of Extracellular Adenosine in Hippocampus and Neostriatum of the Rat. *World J. Neurosci.* 4: 85–91.
37. Dunwiddie, T. V e Masino, S. A. (2001) The role and regulation of adenosine in the Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 31-55.
38. Ceruti, S. e Abbracchio, M. P. (2013) Adenosine Signaling in Glioma Cells, Baranska, J. (ed.) Glioma Signaling, Warsaw: Springer, 13-30 vol. 986.
39. Latini, S. e Pedata, F. (2001) Adenosine in the central nervous system : release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 79: 463–484.
40. Porkka-heiskanen, T. e Kalinchuk, A. V. (2011) Adenosine , energy metabolism and sleep homeostasis. *Sleep Med. Rev.* 15: 123–135.
41. Kao, Y. et al. (2017) Targeting ENT1 and adenosine tone for the treatment of Huntington’s disease. *Hum. Mol. Genet.* 26 (3): 467–478.
42. Vannoni, D. et al. (2004) Enzyme Activities Controlling Adenosine Levels in Normal and Neoplastic Tissues. *Med. Oncol.* 21 (2): 187–195.
43. Jiang, J. X., Riquelme, M. A. e Zhou, J. Z. (2015) ATP, a double-edged sword in cancer. *Oncoscience* 2 (8): 673–674.
44. Xu, Y. et al. (2017) Intracellular adenosine regulates epigenetic programming in

- endothelial cells to promote angiogenesis. *Mol. Med.* 9: 1263–1278.
45. Allard, B., et al. (2016) Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 29: 7–16.
 46. Vijayan, D., et al. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat. Publ. Gr.* 17, 709–724.
 47. Stagg, J. e Smyth, M. J. (2010) Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29: 5346–5358.
 48. Ghiringhelli, F. et al. (2012) Production of Adenosine by Ectonucleotidases : A Key Factor in Tumor Production of Adenosine by Ectonucleotidases : A Key Factor in Tumor Immunoescape. *J. Biomed. Biotechnol.* 1-9.
 49. Gao, Z. W., et al. The Roles of CD73 in Cancer. *Biomed. Res. Int.* 1-9.
 50. Resta, R., et al.(1998) Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol. Rev.* 161: 95–110
 51. Azambuja, J. H. et al. (2019) CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. *Mol. Neurobiol.* 56 (5): 3260-3279.
 52. Xu, S. et al. (2013) Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro-Oncology* 15(9): 1160–1172.
 53. Jin, D. et al. (2010) CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses : A Novel Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression. *Cancer Res.* 70 (6): 2245–2256.
 54. Bavaresco, L. et al. (2008) The role of ecto-5' -nucleotidase / CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* 31: 61-68.
 55. Jiang, T. et al. (2018) Comprehensive evaluation of NT5E / CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. *BMC Cancer* 18: 1-10.
 56. Garcia-gil, M. et al. (2015) The combination of adenosine deaminase inhibition and deoxyadenosine induces apoptosis in a human astrocytoma cell line. *Neurochem. Int.* 80, 14–22.
 57. Garcia-gil, M. et al. (2016) Mitochondrial Damage and Apoptosis Induced by Adenosine. *J. Cell Biochem.* 117: 1671–1679
 58. Franco, R. et al. (1997) Cell Surface adenosine deaminase: Much more than an

- ectoenzyme. *Prog. Neurobiol.* 52: 283-294.
59. Akyol, Ö., et al. (1995) Activities of free radical and DNA turn-over enzymes in cancerous and non-cancerous human brain tissues. *Redox Report* 1: 255-259
 60. Diógenes, M. J. et al. (2014) Homeostatic Control of Synaptic Activity by Endogenous Adenosine is Mediated by Adenosine Kinase. *Cereb. Cortex* 24 (1): 67–80.
 61. Boison, D., (2013) Adenosine Kinase : Exploitation for Therapeutic Gain. *Pharmacol. Rev.* 65: 906–943.
 62. Feng, Q. et al. (2009) Human S-Adenosylhomocysteine Hydrolase: Common Gene Sequence Variation and Functional Genomic Characterization. *J. Neurochem.* 110 (6): 1806–1817.
 63. Leal, J. F. et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase downregulation contributes to tumorigenesis. *Carcinogenesis* 29 (11): 2089–2095.
 64. Yideng, J. et al. (2007) Homocysteine-Mediated Expression of SAHH , Potential Pathogenic Mechanism in VSMCs. *DNA and Cell Biol.* 26 (8): 603–611.
 65. Hermes, M., et al. (2008) Alterations in S -adenosylhomocysteine metabolism decrease O 6 -methylguanine DNA methyltransferase gene expression without affecting promoter methylation. *Biochem. Pharma.* 75: 2100–2111.
 66. Loehrer, F. M. T., et al. (1998) Evidence for disturbed S-adenosylmethionine : S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure : a cause for disturbed methylation reactions? *Nephrol. Dial. Transplant.* 13: 656–661.
 67. Xu, Y. et al. (2017) Regulation of endothelial intracellular adenosine via adenosine kinase epigenetically modulates vascular inflammatio. *Nat. Commun.* 8: 1-16
 68. Eltzhig, H. K. (2009) Adenosine : An Old Drug Newly Discovered. *Anesthesiology* 111 (4): 904–915.
 69. Huang, W., et al. (2017) Functional characterization of human equilibrative nucleoside transporter 1. *Protein Cell* 8 (4): 284–295.
 70. King, A. E., et al. (2006) Nucleoside transporters : from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (8): 416-425.
 71. Shinomiya, A. et al. (2013) 3'-Deoxy-3'-[18F]-fluorothymidine ([18F]-FLT) transport in newly diagnosed glioma: correlation with nucleoside transporter expression, vascularization, and blood–brain barrier permeability. *Brain Tumor Pathol.* 30: 215-223

72. Fredholm, B. et al. (2001) Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53 (4) 527–552.
73. Garcia-gil, M. et al. (2018) Emerging Role of Purine Metabolizing Enzymes in Brain Function and Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (11): 3598.
74. Wang, J. e Matosevic, S. (2019) NT5E/CD73 as Correlative Factor of Patient Survival and Natural Killer Cell Infiltration in Glioblastoma. *J. Clin. Med.* 8: 1526.
75. Huang, J. et al. (2015) Adenosine deaminase and adenosine kinase expression in human glioma and their correlation with glioma-associated epilepsy. *Mol. Med. Rep.* 12 (5): 6509–6516.