

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
FACULDADE DE FARMÁCIA

Daniela Vasconcelos Lopes

**AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NO
CRESCIMENTO DE GLIOBLASTOMA COM FOCO NA MODULAÇÃO
ADENOSINÉRGICA MEDIADA PELO METOTREXATO**

Porto Alegre

2017

Daniela Vasconcelos Lopes

**AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NO
CRESCIMENTO DE GLIOBLASTOMA COM FOCO NA MODULAÇÃO
ADENOSINÉRGICA MEDIADA PELO METOTREXATO**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como parte das exigências para a
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Figueiró.

Co-orientador(a): Prof. Dra. Ana Maria
Oliveira Battastini.

Porto Alegre

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus dois orientadores do laboratório: Fabrício Figueiró e Ana Battastini, pela oportunidade de ser bolsista do laboratório e por todos ensinamentos durante esses quase três anos. Além de admirá-los por todo conhecimento científico, tenho grande admiração pelo profissionalismo e determinação de ambos. Ao Fabrício, em especial, por ter me dado todo auxílio possível para a realização deste trabalho. Pelas dicas e paciência de me esclarecer dúvidas.

A minha companheira do laboratório, Amanda, por todo apoio e amizade. Obrigada por ter me ajudado nos momentos que eu me desesperava e pensava que tudo ia dar errado. A Juliete por todo apoio, dicas sobre o TCC e amizade. Agradeço as duas pelo auxílio nos experimentos deste trabalho.

A todo pessoal do laboratório, incluindo também as pessoas que já não fazem mais parte do grupo: Amanda, Ana, Andressa, Anninha, Carol, Cesar, Elisa, Fabrícia, Fabrício, Juliete, Letícia, Lila, Mery, Robertinha e Thaís. Obrigada pelos ótimos momentos que tivemos juntos, sendo trocando conhecimentos (nos seminários, na bancada ou congresso) ou pelos momentos extra laboratório. Sentirei muita saudade de tê-los no meu dia-a-dia.

Aos meus pais, Silvia e Lindomar, meu profundo agradecimento por todo apoio durante a minha vida, faculdade e TCC. Agradeço por todo carinho, incentivo e paciência em todos esses momentos. Sem eles nada disso seria possível. Tenho grande sorte de tê-los como pais e como amigos.

Aos meus amigos que a UFRGS deu, Taíse e Rafael, por todo companheirismo desde o primeiro semestre até o TCC. A todos meus amigos e familiares, que de alguma forma contribuíram neste percurso e por entenderem minha ausência nos encontros, por causa de alguma prova ou TCC.

Agradeço a todos profissionais da UFRGS e do departamento de bioquímica, que de alguma forma, contribuíram para a minha formação. A todos professores por todos ensinamentos transmitidos.

A Capes, CNPq e FAPERGS pelo suporte financeiro das pesquisas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Glioblastoma multiforme	11
1.2 Anti-inflamatórios.....	13
1.3 Antimetabólitos (Metotrexato).....	14
1.4 Sistema purinérgico	15
1.5 Inflamação no contexto de neoplasias	18
1.6 Glioblastoma, inflamação e sistema purinérgico.....	19
1.7 Metotrexato no contexto de neoplasias e sistema purinérgico.....	20
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Gerais.....	24
3.2 Específicos	24
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Materiais	25
4.2 Cultura de células.....	25
4.3 Isolamento de linfócitos mesentéricos	25
4.4 Avaliação da viabilidade celular.....	26
4.4.1 Viabilidade celular com <i>trypan blue</i>	26
4.4.2 Viabilidade celular pelos métodos MTS e MTT.....	26
4.5 Análise da expressão da enzima 5'NT/CD73 em células de GBM e linfócitos	27
4.6 Tratamentos das células de GBM e linfócitos.....	28
4.6.1 Tratamento das células com anti-inflamatórios	28

4.6.2 Avaliação do papel intracelular da adenosina após tratamento com MTX.....	28
4.6.3 Avaliação do papel intracelular e extracelular da adenosina após tratamento com MTX na presença e na ausência de linfócitos.....	29
4.7 Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Avaliação da viabilidade celular e expressão da 5'NT/CD73 em linfócitos mesentéricos após o tratamento com anti-inflamatórios	31
5.2 Avaliação da viabilidade celular e expressão da 5'NT/CD73 após tratamento das células de GBM com anti-inflamatórios (concentrações plasmáticas).....	31
5.3 Avaliação da viabilidade celular e expressão da 5'NT/CD73 após tratamento das células de GBM com anti-inflamatórios (concentrações citotóxicas).....	33
5.4 Avaliação do papel intracelular e extracelular da adenosina após tratamento com MTX	34
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema simplificado da sinalização purinérgica envolvendo as E-NTPDases, 5'NT/CD73 e receptores purinérgicos.....17
- Figura 2** – Mecanismo proposto pelo qual o MTX leva ao aumento de adenosina no meio extracelular..... 21

LISTA DE ABREVIATURAS

5'NT/CD73 – Ecto-5'-nucleotidase

AAS – Ácido acetil salicílico

ABT-702 – 4-Amino-5- (3-bromofenil) -7- (6-morfolinopiridin-3-il) pirido (2,3-d) pirimidina.

ADA – Adenosina deaminase

ADP – Adenosina 5' difosfato

AICAR – 5- aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleotídeo

AICART– AICAR transformilase

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroides

AK – Adenosina cinase (*adenosine kinase*)

AMP – Adenosina 5' monofosfato

AMPc- AMP cíclico

APCP – Adenosina 5' - (α , β -metileno) difosfato

ATP – Adenosina 5' trifosfato

BHE – Barreira hemato encefálica

E-NTPDase1/CD39 – Ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases 1

COX – Enzima ciclooxigenase

DHFR – Dihidrofolato-redutase

DIP – Dipyridamol

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E-NTPDase – Ecto-nucleosídeo trifosfato- difosfohidrolases

GBM – Glioblastoma multiforme

LNCs – Nanocapsulas lipídicas (*Lipid-core nanocapsules*)

MTX – Metotrexato

MTX glu – Metabólito poliglutamato do MTX

NK – Células *Natural Killer*

OMS – Organização Mundial da Saúde

P1– Receptor purinérgico metabotrópico de adenosina

P2– Receptor purinérgico para ATP

RNA – Ácido ribonucleico

SFB –Soro fetal bovino

SUS –Sistema Único de Saúde

TM –Tampão de marcação

Treg, CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺ – Linfócitos T regulatórios

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most malignant tumor of central nervous system. The ecto-5'-nucleotidase (5'NT/CD73) is overexpressed in GBM microenvironment. The 5'NT/CD73 controls extracellular adenosine level, which has been described as immunosuppressive molecule. Studies have shown that anti-inflammatory drugs, such as indomethacin and dexamethasone have anti-proliferative effect by modulating 5'NT/CD73 expression in GBM cells. Methotrexate (MTX) is an antimetabolite drug, widely used in clinical for cancer and inflammatory diseases, which modulates 5'NT/CD73 expression in GBM cells. However, it is still unclear if the increase of 5'NT/CD73 expression and adenosine formation is related to the MTX antiproliferative effect in tumor cells. Considering the ability of some anti-inflammatory drugs to modulate the 5'NT/CD73 enzyme, one of the aims of the present work was to evaluate the effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): naproxen, piroxicam, meloxicam, ibuprofen, diclofenac sodium, acetylsalicylic acid, acetaminophen, nimesulide and ketoprofen, on the expression of the 5'NT/CD73 enzyme in GBM cells and peripheral lymphocytes. In addition, we seek to increase the knowledge by which MTX inhibits the GBM cells growth. Cell viability and 5'NT/CD73 expression were evaluated in GBM cells and mesenteric lymphocytes after exposure to anti-inflammatory drugs. For analysis of the MTX mechanism, GBM cells were treated with APCP (5'NT/CD73 inhibitor), dipyridamole (inhibitor of adenosine uptake to the intracellular milieu), ABT-702 (inhibitor of adenosine kinase enzyme) and caffeine (non-selective antagonist of P1 adenosine receptors) before treatment with MTX and AMP. Only MTX increased expression of 5'NT/CD73 in GBM cells. Interventions on adenosinergic system did not change the antiproliferative effect of MTX. The cytotoxic effect of MTX is not associated with increased 5'NT/CD73 expression and adenosine levels in the extracellular environment under tested conditions. However, further studies are needed to confirm the results obtained and to understand the role of MTX in the GBM context.

Keywords: Anti-inflammatory drugs, methotrexate, adenosine, ecto-5'-nucleotidase (5'NT/CD73).

RESUMO

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor mais maligno do sistema nervoso central. A enzima ecto-5'-nucleotidase (5'NT/CD73) está superexpressa no microambiente de GBM. A 5'NT/CD73 é responsável pelo controle dos níveis extracelulares de adenosina, a qual é descrita como uma molécula imunossupressora. Estudos demonstraram que fármacos anti-inflamatórios, como a indometacina e dexametasona possuem efeito antiproliferativo em células de GBM, através da modulação da expressão da 5'NT/CD73. O metotrexato (MTX) é um fármaco da classe dos antimetabólitos, amplamente utilizado na clínica para neoplasias e doenças inflamatórias, que modula a expressão da 5'NT/CD73 em células de GBM. Entretanto, ainda não está esclarecido, se o aumento da expressão da enzima 5'NT/CD73 e formação de adenosina, está relacionado ao efeito antiproliferativo do fármaco em células tumorais. Considerando a capacidade de alguns anti-inflamatórios em modular a enzima 5'NT/CD73, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o efeito de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs): naproxeno, piroxicam, meloxicam, ibuprofeno, diclofenaco de sódio, ácido acetil salicílico, paracetamol, nimesulida e cetoprofeno, na expressão da enzima 5'NT/CD73 em células de GBM e em linfócitos periféricos. Além disso, procuramos aprofundar o mecanismo pelo qual o MTX inibe o crescimento de células de GBM. Avaliou-se a viabilidade celular e a expressão da 5'NT/CD73, em células de GBM e linfócitos mesentéricos, após exposição aos fármacos anti-inflamatórios. Para análise do mecanismo do MTX, células de GBM foram tratadas com APCP (inibidor da 5'NT/CD73), dipiridamol (inibidor da captação de adenosina para o meio intracelular), ABT-702 (inibidor da enzima adenosina cinase) e cafeína (antagonista não-seletivo de receptores P1 de adenosina), antes do tratamento com MTX e AMP. Apenas o MTX aumentou a expressão da 5'NT/CD73, em células de GBM. Intervenções no sistema adenosinérgico não alteraram o efeito antiproliferativo do MTX. O efeito citotóxico do MTX não está vinculado ao aumento da expressão da 5'NT/CD73 e níveis de adenosina no meio extracelular, nas condições testadas. Entretanto, são necessários maiores estudos para confirmação dos resultados obtidos e para compreensão do papel deste fármaco no contexto do GBM.

Palavras chave: Anti-inflamatórios, metotrexato, adenosina, ecto-5'-nucleotidase (5'NT/CD73).

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glioblastoma multiforme

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) correspondem a um amplo grupo, altamente heterogêneo, de doenças que apresentam características clínicas, biológicas e histológicas variadas (Ferreira e Rocha, 2004). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os tumores do SNC, baseados em suas características histológicas e moleculares, nos seguintes grupos: astrocitoma e oligodendroglioma difusos; outros tumores astrocíticos; tumores ependimáticos; tumores neuronais e neuronais-gliais mistos; tumores da região pineal; tumores embrionários; tumores dos nervos craniais e paraespinal; tumores das meninges (meningeoma); tumores mesenquimais, não-meningoateliais; tumor melanocítico; linfomas; tumores histiocíticos; tumores das células germinais; tumores da região selar e tumores metastáticos (Louis et al., 2016).

Os astrocitomas difusos, também denominados gliomas difusos, são as neoplasias do SNC mais recorrentes, especialmente em adultos. Historicamente aos gliomas difusos são atribuídos graus de malignidade de II a IV, de acordo com suas características histológicas, levando em consideração a presença/ausência de atividade mitótica marcada, necrose e proliferação microvascular. Sendo o glioblastoma multiforme (GBM) o mais maligno e classificado como grau IV (Louis et al., 2007; Perry e Wesseling, 2016).

O glioblastoma multiforme é caracterizado pela presença de necrose, neoangiogênese, numerosas lesões celulares e alta atividade mitótica (Ohgaki e Kleihues, 2009; Aldape et al., 2015). Possui alta heterogeneidade intratumoral, apresentando muitas células neoplásicas em proliferação, células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos (Solinas et al., 2009; Balkwill e Coussens, 2004). Atualmente, tem se discutido a origem do glioblastoma a partir de células indiferenciadas como células tronco neurais e tronco tumorais (Van Meir et al., 2010).

Este tipo de tumor, geralmente, afeta adultos de meia idade, com maior incidência entre as idades de 40 e 65 anos (Schneider et al., 2010). Os fatores de risco relatados para GBM, são os mesmos para outros tumores cerebrais, incluindo

condições genéticas e exposição a radiações ionizantes (Navas-acién et al., 2002). Os sintomas apresentados, pelos pacientes, dependem da localização do tumor e da progressão da doença, podendo variar de dores de cabeça inexplicáveis, a alterações no campo visual, mudanças de personalidade, deficiências motoras, até convulsões (Umand e Sontheimer, 2017). A sobrevida média, de um paciente diagnosticado com GBM, é inferior a um ano, sendo que esta estatística não se modificou significativamente nas últimas décadas (Holland, 2001).

Apesar dos intensos esforços para o desenvolvimento de novas terapias, ainda não existe tratamento, realmente efetivo, para GBM (Butowski et al., 2006). A ressecção cirúrgica, combinada a outras terapias adjuvantes, é o tratamento recomendado para este tipo de neoplasia. O objetivo de tal estratégia visa remover o tumor com a máxima preservação das funções neurológicas (Tsitlakidis et al., 2010). Entretanto, o alto grau de invasividade tumoral impede uma ressecção completa do tumor e, conseqüentemente, leva a recorrências da neoplasia (Stupp et al., 2007). Em casos inicialmente inoperáveis ou recorrentes, a radioterapia desempenha um papel essencial no tratamento paliativo do tumor. Através de irradiação focal é possível estabilizar ou melhorar as condições funcionais de muitos pacientes (Tsao et al., 2005; Bleehen e Stenning, 1991).

Quimioterápicos são utilizados apenas como adjuvantes no tratamento de GBM, pois a presença da barreira hematoencefálica (BHE) faz com que este tipo de tratamento seja pouco efetivo, produzindo efeitos benéficos de curta duração para alguns pacientes (Stupp et al., 2007; Huncharek et al., 1998). Os quimioterápicos mais utilizados para GBM apresentam características altamente lipofílicas que permitem atravessar a BHE. É o caso da temozolomida e das nitrosuréias (Mousseau et al., 1993). Um estudo clínico realizado em 2004 mostrou que a utilização da temozolomida como adjuvante, juntamente a radioterapia pós-cirurgia, leva apenas a um breve aumento da sobrevida dos pacientes, em comparação aos que realizaram apenas radioterapia pós-cirurgia (Stupp et al., 2005). Por não apresentar superioridade em relação ao tratamento com a nitrosuréia carmustina (medicamento fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS)) e seu preço ser pelo menos 11 vezes maior que o da carmustina, a temozolomida não está incorporada no tratamento pós-operatório de pacientes portadores de glioblastoma multiforme no âmbito do SUS (Brasil, 2014; ANVISA, 2017).

1.2 Anti-inflamatórios

Diversos fármacos anti-inflamatórios tiveram origem em descobertas feitas ao acaso, pela utilização de plantas e seus extratos para o alívio de dor, febre e inflamação (Rainsford, 2007). Como exemplo a salicilina, composto encontrado na casca do salgueiro, é metabolizada a ácido salicílico, que apresenta propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas (Rao e Knaus, 2008; Maclagan, 1876). No final do século XIX utilizava-se o ácido salicílico em função de suas propriedades farmacológicas, entretanto, o mesmo apresentava sabor amargo e, causava irritação gástrica (Rao e Knaus, 2008). Em 1899 foi sintetizado o Ácido Acetil Salicílico (AAS), conhecido comercialmente por aspirina, que apresenta características palatáveis (Frölich, 1997). O AAS faz parte da classe dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), os quais estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo (Frölich, 1997). Após 72 anos de sua descoberta, foi demonstrado que o AAS era capaz de inibir a síntese de prostaglandinas através da inibição da ciclooxigenase (COX) (Douthwaite e Lintott, 1938).

Devido a descoberta do mecanismo de ação do AAS, a década de 70 foi marcada pela descoberta de novos AINEs, incluindo o diclofenaco de sódio (Hippisley-Cox et al., 2005, Gené et al., 2008; Lesney, 2004). Os AINEs representam um grupo de compostos heterogêneos, que tem como principal mecanismo de ação a inibição da enzima COX. Tal enzima é responsável pela conversão do ácido araquidônico a vários eicosanoides, incluindo tromboxanos e prostaglandinas (Batlouni, 2010; Catella-Lawson et al. 2001; Vane e Botting, 1998). São descritas, principalmente, duas principais isoformas para esta enzima, designadas COX-1 e COX-2 (Cryer e Feldmann, 1998).

A isoforma COX-1 está presente na maioria dos tecidos. Está relacionada a produção de prostaglandinas e tromboxanos, que desempenham importante papel na manutenção das funções fisiológicas, incluindo controle do fluxo renal, homeostasia e proteção da mucosa intestinal. Por outro lado a COX-2 está expressa em maior quantidade em processos inflamatórios, mediante a presença de citocinas, fatores de crescimento e endotoxinas. A COX-2 produz prostaglandinas que estão envolvidas no desenvolvimento de edema, rubor e febre (Fitzgerald e Patrono, 2001; FitzGerald et al., 1984).

Os diferentes tipos de AINEs variam em seus efeitos inibitórios relativos as duas isoformas da COX, podendo ser seletivos ou não-seletivos para a COX-2 (Cryer e Feldman, 1998; Rodriguez e Hernández-díaz, 2001). Os AINEs não seletivos, também denominados tradicionais, podem apresentar preferência de inibição para COX-2 semelhante aos AINEs seletivos para COX-2 (COXIBEs), como é o caso da nimesulida. Enquanto que outros AINEs tradicionais inibem, praticamente, de igual modo as duas isoformas da COX, como é o caso do ibuprofeno e naproxeno (Pairet et al., 1998; Dubois et al.; Rao e Knaus, 2008). Os efeitos gastrointestinais, um dos efeitos adversos mais importante dos AINEs, estão relacionados a inibição da COX-1, com conseqüente bloqueio da produção das prostaglandinas protetoras desse sistema (Lanas e Scheiman, 2007).

1.3 Antimetabólitos (Metotrexato)

Antimetabólitos são fármacos estruturalmente semelhantes a metabólitos que desempenham alguma função celular, tendo como protótipo o metotrexato, um fármaco antifolato. O metotrexato (MTX) é um dos agentes terapêuticos mais eficazes, disponível para o tratamento de variados tipos de tumores sólidos, doenças malignas hematológicas e doenças auto-imunes (McGuire, 2003; Purcell e Ettinger, 2003). Estruturalmente, o MTX é análogo ao ácido fólico e atua inibindo competitivamente a enzima dihidrofolato-redutase (DHFR). Esta inibição resulta na depleção de tetrahidrofolatos, que são necessários para a síntese de purinas e timidilato. Conseqüentemente, a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico), bem como outras reações metabólicas, são interrompidas (McGuire, 2003; Grim et al., 2003).

Sua ação é mais marcante sobre populações celulares em fase de crescimento exponencial, o que explica sua maior atividade sobre células tumorais e tecidos em proliferação (Huennekens et al., 1994). Este fármaco é amplamente utilizado como adjuvantes na clínica para diversos tipos de câncer. Entre eles o câncer de mama, de cabeça e pescoço, de cérebro, de ovários e leucemias (McGuire, 2003).

Apesar de existirem estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstram potente atividade do MTX contra GBM, há poucos estudos clínicos que demonstrem eficácia neste tipo de neoplasia (Cooper et al., 2015). Em um ensaio clínico realizado em pacientes

pediátricos com glioma de alto grau, o MTX foi utilizado em altas doses para o tratamento prévio à quimio-radioterapia. Os pacientes que possuíam altas doses de MTX incluso ao protocolo de tratamento tiveram aumento da sobrevida, de 1 ano (grupo controle) para 1,5 anos (Wolff et al., 2011).

Além do efeito antiproliferativo, o MTX possui efeito anti-inflamatório e imunossupressor, sendo utilizado em baixas doses para o tratamento de artrite reumatoide, psoríase e outros problemas crônicos inflamatórios (Cronstein, 2005; Weinblatt et al., 1985). O provável mecanismo responsável por estes efeitos está relacionado a capacidade do MTX em aumentar a quantidade de adenosina no meio extracelular, e da ligação da adenosina extracelular a receptores específicos (Cronstein, 2010; Montesino et al., 2007; Morabito et al. 1998).

1.4 Sistema purinérgico

Os nucleotídeos e nucleosídeos tradicionalmente são conhecidos pela suas funções energéticas no meio intracelular, contudo, atualmente está bem estabelecido o papel dessas moléculas como mensageiros extracelulares, participando de sinalizações que influenciam em uma variedade de efeitos biológicos no meio intracelular (Burnstock, 2006 (a); Burnstock, 2007). Esses efeitos são mediados através da ligação dos nucleotídeos e nucleosídeos a receptores específicos, denominados purinoreceptores (Illes et al.,2000).

Os purinoreceptores fazem parte da via de sinalização denominada sistema purinérgico. Esta via de sinalização inclui as purinas derivadas da adenina (como o nucleosídeo de adenosina 5' trifosfato, ATP), as purinas derivadas de guanina, metabólitos de xantinas, hipoxantinas, entre outros (Schmidt, 2007). Entretanto, a adenosina e o ATP extracelulares são considerados os principais efetores deste sistema, devido aos seus importantes papéis já bem elucidados como neurotransmissores e neuromoduladores do sistema nervoso central e periférico, além de estarem envolvidos na resposta imune (Burnstock ,2006(a), Burnstock,2006(b); Ralevic e Burnstock, 1998; Faas et al., 2017).

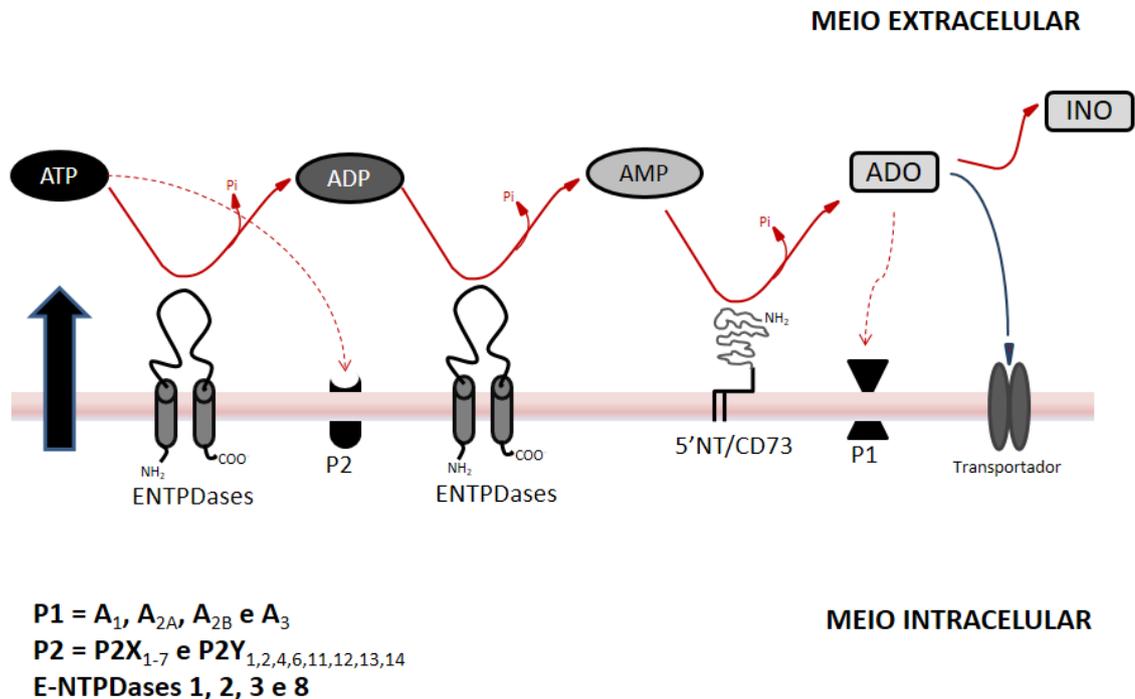
Em condições fisiológicas são encontradas baixas concentrações de ATP no meio extracelular (Bakker et al., 2007; Ryan et al.,1996). No entanto, vários tipos

celulares podem liberar ATP para o meio extracelular em condições como hipóxia, isquemia, inflamação, necrose e apoptose (Gallucci e Matzinger, 2001).

No meio extracelular o ATP se liga aos receptores P2, que subdividem-se em receptores P2X (receptores ionotrópicos) e P2Y (receptores metabotrópicos), exercendo uma série de efeitos no meio intracelular (Burnstock, 2007). Além disso, o ATP extracelular é rapidamente metabolizado a adenosina 5' difosfato (ADP) e adenosina 5' monofosfato (AMP) pelas fosfatases alcalinas, ecto-nucleotídeo-pirofosfatases/ fosfodiesterases (ENPPs) ou ecto-nucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases (E-NTPDases), que inclui a E-NTPDase 1, também denominada E-NTPDase1/CD39 (Burnstock e Boeynaems, 2014). O AMP formado é convertido ao nucleosídeo adenosina pela ação da ecto-5'-nucleotidase também conhecida como 5'NT/CD73 (Burnstock and Boeynaems, 2014) (**Figura 1**). A adenosina formada pode seguir a metabolização extracelular em inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico ou pode ser transportada para o meio intracelular via transportadores de nucleosídeos, onde pode ser degradada a inosina pela ação da enzima adenosina deaminase (ADA) ou ser fosforilada a AMP pela ação da adenosina cinase (AK) (Latini e Pedata, 2001; Burnstock, 2017; Boison, 2013).

A 5'NT/CD73 é uma enzima extracelular amplamente distribuída na superfície de células de tecido humano, incluindo, hepatócitos, linfócitos, células endoteliais e fibrócitos (Zhang, 2010). Estudos demonstraram que esta enzima está altamente expressa em vários tipos de tumores sólidos, como no GBM, câncer de colo-retal, câncer mama e câncer de próstata (Bavaresco et al., 2008; Wu et al., 2012; Loi et al., 2013; Leclerc et al., 2016). O papel da 5'NT/CD73 na progressão do câncer ainda não está totalmente esclarecido, muitos estudos demonstram que a expressão desta enzima está associada a progressão do câncer, contribuindo com a invasividade tumoral, angiogênese, metástase e resistência a terapias (Wang et al., 2017). Entretanto, alguns estudos demonstraram que alta expressão da enzima pode contribuir para um melhor prognóstico, levando a um menor grau de diferenciação tumoral (Wang et al, 2017; Oh et al., 2012). A 5'NT/CD73 juntamente com a enzima CD39, participa do controle dos níveis de adenosina extracelular, sendo a 5'NT/CD73 a principal enzima responsável pela formação de adenosina no meio extracelular a partir dos nucleotídeos de adenina liberados (Zimmermann, 2000).

Figura 1. Esquema simplificado da sinalização purinérgica envolvendo as E-NTPDases, 5'NT/CD73 e receptores purinérgicos.



ATP= adenosina 5' trifosfato, ADP= adenosina 5' difosfato, AMP= adenosina 5' monofosfato, ADO= adenosina, INO= inosina, P2= receptor de ATP, P1= receptor de adenosina, NTPDases= ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases, CD73= ecto-5'-nucleotidase. Créditos da imagem: Liliana Rockenbach.

A adenosina, gerada no meio extracelular, exerce uma série de efeitos fisiológicos via ligação a receptores transmembrana, acoplados a proteína G (Blackburn, 2009; Ralevic and Burnstock, 1998). Estes receptores são classificados em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Ralevic and Burnstock, 1998).

Os receptores A_{2A} e A_{2B} atuam ativando a adenilil ciclase (AC), conseqüentemente, aumentam os níveis de AMP cíclico (AMPC) e, estão relacionados a imunossupressão (Ohta et al., 2006; Vecchio et al., 2016). Em diversas condições patológicas, como inflamações crônicas e tumores, foi constatado o acúmulo de adenosina no meio extracelular. Em níveis elevados, a adenosina se liga aos receptores A_{2A}, causando indução de linfócitos Treg e inibição de linfócitos efetores e macrófagos, desta forma, gera um microambiente tumoral imunossuprimido (Ernst et al., 2010; Zarek et al., 2008).

Os receptores A_1 e A_3 , por sua vez, inibem a geração de AMPc, e estão associados a promoção da imunidade (Cronstein et al., 1992; Butler et al., 2012). Acredita-se que o receptor A_3 possa ser um potencial alvo terapêutico, devido a sua alta expressão em células inflamatórias e neoplásicas, em comparação à células saudáveis (Gessi et al., 2011). Já foi demonstrado que este receptor está envolvido no ciclo celular, apresentando atividade pró- e anti-apoptótica, de acordo com o nível de ativação do receptor (Jacobson, 1998; Gessi et al., 2011).

1.5 Inflamação no contexto de neoplasias

O papel da inflamação, no contexto de neoplasias, vem sendo amplamente investigado. Atualmente sabe-se que um ambiente rico em células inflamatórias e fatores de crescimento potencializam e/ ou promovem o risco a neoplasias (Coussens e Werb, 2002). Desta forma, a redução da inflamação pode representar uma estratégia válida para a prevenção e tratamento de neoplasias (Rayburn et al., 2009).

Tem sido relatado que fármacos anti-inflamatórios, dentre eles os AINEs, possuem a capacidade de aumentar a apoptose, diminuir a migração e diminuir a angiogênese de tumores (Jana, 2008; Zlotnik, 2006; Albin et al., 2005; Sawak, 1999). Entretanto, o mecanismo pelo qual os AINEs influenciam na proliferação neoplásica, ainda não está totalmente esclarecido.

Estudos experimentais, epidemiológicos e clínicos sugerem que os AINEs podem contribuir para a prevenção do crescimento de células neoplásicas através da inibição da COX (Grubbs et al., 2000; Williams et al., 2000). Foi demonstrado que diversos tipos de tumores superexpressam a enzima COX-2, como é o caso do câncer de mama, de bexiga e de cólon, sugerindo papel importante da COX na vascularização e crescimento dos tumores (Shirahama et al., 2000; Hwang et al., 1998; Thun et al., 2002).

Outros estudos sugerem que o efeito antiproliferativo dos AINEs, pelo menos em parte, é independente da COX e inibição da síntese de prostaglandinas (Tegeeder et al., 2002; Baek et al., 2002). Um estudo prévio realizado pelo nosso laboratório, demonstrou que a indometacina aumenta os níveis da enzima 5'NT/CD73, a qual é uma das principais responsáveis pela formação de adenosina no meio extracelular, a

partir de nucleotídeos de adenina. Assim, a adenosina, produzida extracelularmente, estaria contribuindo para a diminuição da proliferação das células de GBM por uma possível ligação aos receptores A₃ (Bernardi et al., 2007).

Além dos AINEs, outras classes de fármacos anti-inflamatórios demonstraram possível modulação da proliferação de células tumorais. Como exemplo, a dexametasona, um anti-inflamatório da classe dos corticosteroides, demonstrou, em estudos *in vivo*, contribuir para a prevenção de câncer de pulmão e também, contribuir na eficácia de quimioterápicos em modelos de glioma, de câncer de mama, de pulmão e colo (Witschi et al, 2005; Wang et al., 2004; Wang et al., 2007). Nosso laboratório demonstrou previamente que a dexametasona, assim como a indometacina, leva ao aumento da expressão da 5'NT/CD73 em células de GBM, contribuindo com a hipótese de que a adenosina pode estar envolvida no papel anti-inflamatório, tanto de fármacos não-esteroides, como de corticosteroides (Bavaresco et al., 2007).

1.6 Glioblastoma, inflamação e sistema purinérgico

A presença de infiltrado inflamatório no GBM está diretamente relacionada ao grau de malignidade do tumor (Watters et al., 2015). A presença de leucócitos, como macrófagos, microglia e linfócitos são componentes indispensáveis nos processos de proliferação, migração e sobrevivência celular (Watters et al., 2015).

Os linfócitos T regulatórios (Treg, CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺), em condições fisiológicas, controlam a renovação celular do timo, regulando a expansão linfocítica, inflamação crônica e processos autoimunes. No entanto, em certas condições patológicas, como no câncer, os linfócitos Treg podem favorecer o crescimento tumoral, através da inibição dos linfócitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) e células *Natural Killer* (NK), contribuindo para a imunossupressão do microambiente tumoral (Bastid et al., 2012; Borsellino et al., 2007). Sendo assim, a presença de elevados níveis de linfócitos Treg e baixos níveis de linfócitos T citotóxicos estão relacionados a um prognóstico desfavorável em GBM (Han et al., 2014; Sayour et al., 2015).

O controle da hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP pela enzima E-NTPDase1/CD39 e, AMP pela enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73, está estritamente relacionado à imunomodulação, através, dentre outras células, dos linfócitos Treg em

pacientes com glioma (Albesiano et al., 2010). Foi demonstrado que linfócitos Treg superexpressam a enzima E-NTPDase1/CD39 em suas superfícies, gerando uma maior quantidade de AMP no meio extracelular. Esse AMP gerado é degradado a adenosina pela 5'NT/CD73, como já descrito, a qual está superexpressa na superfície de células de GBM (Bavaresco et al., 2008). Assim, há a hipótese de que essas duas enzimas estariam trabalhando de forma cooperativa para a geração de adenosina, a qual modula a produção de citocinas e inibe a proliferação de células imune efetoras, culminando em imunossupressão e crescimento tumoral (Xu et al., 2013).

1.7 Metotrexato no contexto de neoplasias e sistema purinérgico

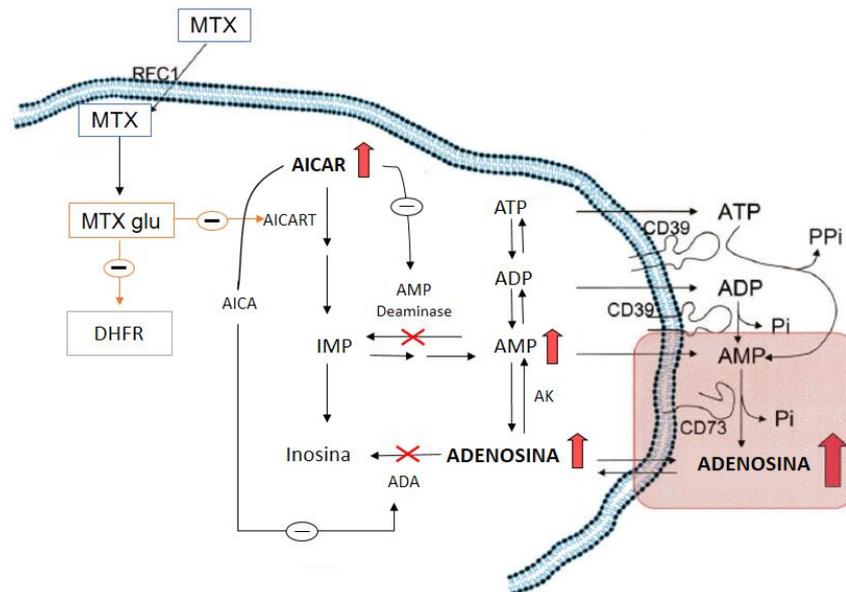
Estudos *in vivo* demonstraram que um dos metabólitos ativos do MTX, a forma poliglutamato (MTX glu), é capaz de inibir a AICAR transformilase (AICART) e assim levar ao acúmulo de AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleotídeo) (**Figura 2**). O ribonucleotídeo AICAR é um inibidor competitivo da enzima AMP deaminase, levando ao aumento dos níveis de AMP intracelular, que pode ser desfosforilado intra- ou extracelularmente a adenosina (Baggott et al., 1994; Cronstein et al., 1993; Morabito et al., 1998). Além disso, o ribonucleosídeo AICA (metabólito defosforilado de AICAR), é um inibidor competitivo da adenosina deaminase (ADA). A inibição da ADA pode levar ao acúmulo direto de adenosina e liberação deste nucleosídeo para o meio extracelular (Montesinos et al., 2007).

O aumento de nucleotídeos e nucleosídeos, no meio intracelular, pode levar por exocitose e/ou gradiente de concentração, ao aumento destes no meio extracelular. Uma vez no meio extracelular, esses nucleotídeos podem estar sendo convertidos a adenosina pela ação das ecto-nucleotidases. O aumento de adenosina no meio extracelular, promovido pelo MTX, vem sendo relacionado ao efeito anti-inflamatório apresentado pelo fármaco (Cronstein et al., 1993 ; Morabito et al., 1998; Montesinos et al., 2007). A adenosina gerada demonstrou atividade imunossupressora em modelo de inflamação em ratos (Montesinos et al., 2007).

Estudos realizados pelo nosso laboratório mostraram que o MTX é capaz de aumentar as enzimas do sistema purinérgico ancoradas a membranas das células, principalmente a expressão da enzima 5'NT/CD73, culminando no aumento de adenosina no meio extracelular. Concordantemente, foi demonstrado que o MTX

levou ao aumento da atividade AMPásica (hidrólise de AMP) em células de GBM C6 (Figueiró et al., 2016).

Figura 2. Mecanismo proposto pelo qual o MTX leva ao aumento de adenosina no meio extracelular.



RFC1= transportador de folato reduzido; MTX= Metotrexato; MTX glu = metabólito MTX poliglutamato; DHFR= di-hidro-folato-redutase; AICAR= 5- aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleotídeo; AICART= AICAR transformilase; AICA= AICA riblonucleosídeo; IMP= Inosina monofosfato; ADA= adenosina deaminase; AK= adenosina cinase; PPi= pirofosfato inorgânico; Pi= fosfato inorgânico; CD73= ecto-5'-nucleotidase; CD39= E-NTPDase 1. Fonte: Adaptação de Montesinos et al., 2007.

Avaliou-se o efeito do MTX em nanocápsulas lipídicas (MTX-LNC), em modelo de GBM implantado em cérebro de ratos *Wistar*. Os resultados mostraram que o MTX-LNCs reduz a porcentagem de linfócitos T efetores e T regulatórios no microambiente tumoral e, leva ao aumento da expressão da 5'NT/CD73 nas células de GBM, assim como demonstrado nos resultados *in vitro*. Foi constatado aumento da expressão desta enzima também em superfície de linfócitos CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, após tratamento com MTX-LNCs (Figueiró et al., 2015; Figueiró et al., 2016). Sendo assim, o MTX-LNCs gerou um aumento ainda maior de adenosina no microambiente de GBM, o qual já possui altos níveis desse nucleosídeo, devido à alta expressão da 5'NT/CD73 (Figueiró et al., 2016; Bavaresco et al., 2008; Wink et al., 2003). A hipótese sugerida é que essa elevada concentração de adenosina proporcionada pelo

tratamento com MTX-LNCs, somada aos outros efeitos atribuídos ao MTX, pode gerar uma supressão inclusive de linfócitos Treg, que desempenham papel importante na imunossupressão de GBM. Essa diminuição de linfócitos Treg no microambiente tumoral, pode levar a diminuição da imunossupressão induzida por Treg, permitindo assim, o recrutamento e diferenciação de células T efetoras, tais como os linfócitos T citotóxicos e células NK. Em outras palavras, a hipótese sugerida é que o MTX, ao contribuir com o aumento dos níveis de adenosina, pode estar diminuindo a imunossupressão característica do microambiente do GBM, permitindo a troca de um perfil pró-tumoral para um perfil anti-tumoral (Figueiró et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

O papel da imunomodulação no câncer é assunto de intensas pesquisas nos dias de hoje. Sabe-se que inflamação proporciona um ambiente favorável para o desenvolvimento de variados tipos de neoplasias (Coussens e Werb, 2002). Diversos fármacos anti-inflamatórios demonstram eficácia em modelos de câncer ou na prevenção do crescimento neoplásico. O mecanismo pelo qual estes fármacos anti-inflamatórios contribuem na eliminação de células neoplásicas pode estar relacionado com a produção de adenosina.

Estudos prévios, realizados pelo nosso laboratório, mostraram que os anti-inflamatórios, indometacina e dexametasona, aumentam os níveis da 5'NT/CD73 em células de GBM (Bernardi et al., 2007; Bavaresco et al., 2007). Nosso grupo também demonstrou que o MTX, um antimetabólito que apresenta atividade anti-inflamatória, aumenta a expressão da 5'NT/CD73 em células de GBM. Todavia, ainda é desconhecido o papel de vários fármacos anti-inflamatórios quanto a expressão da 5'NT/CD73 em células de GBM.

Com base nessas considerações, a hipótese apresentada é que outros fármacos anti-inflamatórios também podem ter como mecanismo a modulação da enzima 5'NT/CD73. Além disso, outra justificativa do trabalho é que a modulação do sistema adenosinérgico pelo MTX pode estar relacionada com a citotoxicidade desse fármaco diretamente em células de GBM.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de fármacos anti-inflamatórios na expressão da 5'NT/CD73 e viabilidade celular, em células de GBM e linfócitos mesentéricos. Além disso, aprofundar os conhecimentos sobre o mecanismo pelo qual o MTX inibe o crescimento de células de GBM.

3.2 Objetivos específicos

- I) Avaliar a expressão da enzima 5'NT/CD73 e a viabilidade celular, em células de GBM e linfócitos periféricos (total e subpopulações de linfócitos), após o tratamento com concentrações plasmáticas de fármacos anti-inflamatórios;
- II) Avaliar a expressão da enzima 5'NT/CD73 e a viabilidade celular em células de GBM, após o tratamento com concentrações citotóxicas de fármacos anti-inflamatórios;
- III) Avaliar um possível papel intracelular da adenosina no efeito antiproliferativo apresentado pelo MTX, em células de GBM;
- IV) Avaliar o papel extracelular da alta concentração de adenosina, no efeito antiproliferativo apresentado pelo MTX, em células de GBM;
- V) Avaliar o papel intracelular e extracelular da adenosina no efeito citotóxico apresentado pelo MTX, em células de GBM após co-cultura com linfócitos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB), *Fungizona*[®], penicilina/estreptomicina e solução de tripsina/EDTA 5% foram obtidas da *Gibco* (EUA). Dimetilsulfóxido (DMSO), ABT-702 (4-Amino-5- (3-bromofenil) -7- (6-morfolinopiridin-3-il) pirido (2,3-d) pirimidina), AMP, APCP (Adenosina 5' - (α, β-metileno) difosfato), dipiridamol (DIP), MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium) e corante *trypan blue* foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). MTX foi fornecido da Pharma Nostra (Brasil). Nimesulida, naproxeno, meloxicam foram obtidos da All Chemistry (Brasil). Cetoprofeno, ácido acetil salicílico e diclofenaco de sódio, da SM empreendimentos (Brasil). Piroxicam da Galena (Brasil), paracetamol da Genix (Brasil) e ibuprofeno da Valdequímica (Brasil). MTS foi obtido da Promega (EUA). Os anticorpos primários de ratos anti-CD73 obtidos da *ectonucleotidases antibodies* (disponível em <http://ectonucleotidases-ab.com>). Anticorpos secundários de ratos conjugados- FITC da Invitrogen (EUA). Os anticorpos conjugados CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD4⁺CD25^{high} obtidos da BD Biosciences (EUA). Todos os outros reagentes utilizados nesse trabalho possuem grau analítico.

4.2 Cultura de células

A linhagem de GBM de rato C6 obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, USA) foi cultivada em frascos de cultura e mantidas em meio DMEM (pH 7,4), contendo antibióticos penicilina/estreptomicina 0.5 U/ml, e suplementadas com 5% de soro fetal bovino (SFB), e mantidas em incubadora a 37°C, com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂.

4.3 Isolamento de linfócitos mesentéricos

O isolamento dos linfócitos mesentéricos de ratos *Wistar* adultos, foi realizado conforme já descrito (Scherer et al., 2012) e com aprovação do comitê de ética da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Protocolo # 26389). Os gânglios linfáticos mesentéricos foram removidos e dissociados através de uma malha metálica em solução salina 0,9% e filtrados com malha de 40 μ M. As células foram lavadas três vezes com a solução salina e centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos.

4.4 Avaliação da viabilidade celular

4.4.1 Viabilidade celular com *trypan blue*

No final dos tratamentos, o meio de cultivo foi removido e as células C6, aderidas a placa de 24 poços, foram lavadas com 100 μ L de tampão fosfato-salino. Após, as células C6 foram soltas da placa por tripsinização (adição de 100 μ L de tripsina/EDTA 5% por poço e neutralização com 200 μ L de DMEM 5%). Para análise da viabilidade dos linfócitos mesentéricos não foi necessária a etapa de tripsinização, pois são células em suspensão. Adicionou-se 10 μ L do corante *trypan blue* a 30 μ L do meio contendo células C6 ou linfócitos mesentéricos. Após, foi realizada contagem das células não coradas em câmara de Neubauer. O *trypan blue* marca apenas células mortas, cujas membranas estão danificadas, enquanto que, as células viáveis, permanecem não coradas. Desta forma, o percentual de células não coradas, em relação ao controle (células não expostas ao tratamento), representa o índice de células viáveis (Walum et al.,1990).

4.4.2 Viabilidade celular pelos métodos MTS e MTT

Para análise da viabilidade celular pelo método MTS, ao final dos tratamentos, foi adicionado 20 μ L da solução do kit MTS a cada poço (placa de 96 poços) e incubou-se a placa por 2 horas a 37°C, com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂. Após 2 horas de incubação, foi realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda igual a 490 nm.

O kit MTS é um método colorimétrico de quantificação de células viáveis. Este método se baseia na redução do composto MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-

carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium) por células viáveis, gerando um produto formazan cromogênico, solúvel em meio de cultura. Este processo é realizado por enzimas desidrogenases, que são enzimas mitocondriais, presentes em células viáveis. A mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, podendo ser quantificado através da medida da absorbância, em comprimento de onda igual a 490 nm.

Para o método do MTT, no final dos tratamentos, foi removido o meio de cultivo. As células aderidas a placa (células C6 viáveis), foram lavadas duas vezes com 100 µl de tampão fosfato-salino. Após remoção do tampão fosfato-salino, adicionou-se, a cada poço, 90 µl de meio de DMEM 5% e 10 µl de MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium) (5 mg mL^{-1}). As células foram incubadas por 2 horas, a 37°C. Após o tempo de incubação, a solução foi removida, permanecendo o precipitado formado. Um total de 100 µl de DMSO foi adicionado a cada poço, e a absorbância foi lida em comprimento de onda de 570 e 630 nm.

O princípio do método MTT é semelhante ao MTS. Visto que, ambos são métodos colorimétricos, baseados na redução de um composto formazan por enzimas mitocondriais. Esse método é preferível em relação ao MTS quando precisamos remover o sobrenadante, como no caso da co-cultura entre células de GBM e linfócitos, descrita abaixo.

4.5 Análise da expressão da enzima 5'NT/CD73 em células de GBM e linfócitos

Após o tratamento, as células de GBM C6 foram soltas da placa de 24 poços por tripsinização (adição de 100 µL de tripsina/EDTA 5% por poço e neutralização com 200 µL de DMEM 5%) e centrifugadas a 1200 rpm, por 6 minutos. O meio de cultivo contendo os linfócitos mesentéricos tratados (linfócitos não aderem a placa), foi centrifugado por 1200 rpm durante 6 minutos. Após centrifugação, as células C6 e os linfócitos, de forma independente, foram suspensos no tampão de marcação (TM, 2% SFB em PBS) contendo o anticorpo primário para 5'NT/CD73, em volume de 100 µL/tubo, e incubados por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente a incubação do anticorpo primário, as células foram lavadas duas vezes com TM (adição

de 1ml de TM e centrifugação a 1200 rpm por 6 minutos). As células C6 e os linfócitos foram incubados com o anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado a FITC, por 30 minutos na ausência de luz. As marcações com anticorpos para CD3⁺CD4⁺ (conjugado a APC), CD3⁺CD8⁺ (conjugado a PerCP) e CD4⁺CD25^{high} (conjugado a PE), para distinção de linfócitos T, foram concomitantes à marcação com anticorpo secundário FITC para 5'NT/CD73, nos linfócitos mesentéricos. Posteriormente a incubação, as células foram lavadas duas vezes com TM, para retirada dos anticorpos que não se ligaram ao antígeno. A aquisição dos resultados da análise da expressão da 5'NT/CD73 em células de GBM C6 foi feita através de citômetro *FACS Calibur*, equipado com um *software CellQuest®* e a análise através de *FLOWJO® software*. Para aquisição dos resultados da expressão da 5'NT/CD73 no total e nas subpopulações de linfócitos periféricos foi utilizado citômêtro *BD Accuri™ C6 Plus* equipado a *BD Accuri™ C6 Plus software*.

4.6 Tratamentos das células de GBM e linfócitos

4.6.1 Tratamento das células com anti-inflamatórios

Linfócitos mesentéricos e células de GBM C6 foram semeados, de forma independente, em placas de 24 poços. Ambos tipos celulares, foram expostos às concentrações plasmáticas dos fármacos metotrexato, naproxeno, piroxicam, meloxicam, ibuprofeno, diclofenaco de sódio, ácido acetil salicílico, paracetamol, nimesulida e cetoprofeno (**Tabela 1**), por 48 horas. Sob as mesmas condições de cultivo, células C6 foram expostas às concentrações citotóxicas dos fármacos anti-inflamatórios (**Tabela 1**), por 48 horas. DMSO (solvente utilizado para diluição dos fármacos) foi utilizado como controle. Após 48 horas de tratamento, foi realizada análise da viabilidade celular utilizando o corante *trypan blue* e análise da expressão da enzima 5'NT/CD73 como descrito acima.

4.6.2 Avaliação do papel intracelular da adenosina após tratamento com MTX

Em placas de 24 poços, foram semeadas células de GBM C6. Após atingirem confluência adequada, as células foram expostas a 10 µM de dipiridamol (DIP, inibidor do transporte de adenosina para o meio intracelular) e a 0,1 µM de ABT-702 (inibidor

da adenosina cinase), 30 minutos antes do tratamento com 1 μM de MTX. As células também foram tratadas somente com DIP, ABT-702 e DMSO. Após 24 e 48 horas de exposição ao tratamento, foi avaliada a viabilidade celular, utilizando o corante *trypan blue*, como já descrito.

Tabela 1. Concentrações plasmáticas e citotóxicas dos fármacos anti-inflamatórios.

Composto	Concentrações plasmáticas	Concentrações citotóxicas
Metotrexato	1 μM	1 μM
Naproxeno	400 μM	2 mM
Piroxicam	20 μM	1 mM
Meloxicam	5 μM	500 μM
Ibuprofeno	100 μM	1 mM
Diclofenaco de sódio	5 μM	500 μM
Ácido Acetil salicílico	1500 μM	3 mM
Paracetamol	200 μM	1 mM
Nimesulida	20 μM	500 μM
Cetoprofeno	50 μM	3 mM

Fontes: *Medscape*, *Drugs.com*, Base de dados *Micromedex*, referências bibliográficas do trabalho.

4.6.3 Avaliação do papel intracelular e extracelular da adenosina após tratamento com MTX na presença e na ausência de linfócitos

Células C6 foram semeadas em placas de 96 poços. Após adquirirem confluência adequada, foram tratadas com DIP, ABT-702, APCP (inibidor competitivo da enzima CD73) e cafeína (inibidor não seletivo de receptores P1 de adenosina) isoladamente ou em combinação com MTX (**Tabela 2**). Além disso, foi analisado o efeito da adição de 20 μM AMP ao tratamento. A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTS, conforme descrito anteriormente. Alternativamente, para aproximar o modelo *in vitro* do microambiente tumoral, adicionamos linfócitos aos poços (5×10^3 /poço), em co-cultura entre células C6 e linfócitos, seguindo os mesmos tratamentos descritos na tabela 2. Para essa abordagem quantificamos a viabilidade das células C6, excluindo os linfócitos com lavagens, pelo método do MTT, conforme descrito acima.

Tabela 2. Concentrações dos inibidores e MTX utilizadas no tratamento de células de GBM C6, por 24 e 48 horas.

Composto	Combinações
DMSO	-
MTX	1 μ M
DIPIRIDAMOL (DIP)	5 μ M
DIP + MTX	5 μ M de DIP + 1 μ M de MTX
ABT-702 (ABT)	0,1 μ M
ABT + MTX	0,1 μ M de ABT + 1 μ M de MTX
APCP	10 μ M
APCP + MTX	10 μ M de APCP + 1 μ M de MTX
CAFEÍNA (CAF)	30 μ M
CAF + MTX	30 μ M de CAF + 1 μ M de MTX

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism*® 5.0 para Windows (*GraphPad, San Diego, CA, USA*). Foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via (seguido do pós-teste de *Tukey*) e de duas vias (seguido de teste de Bonferroni). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (D.P). Foi considerada significância estatística com valores menores a 0,05 ($p < 0,05$), em um intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da viabilidade celular e expressão da 5'NT/CD73 em linfócitos mesentéricos após o tratamento com anti-inflamatórios

Os linfócitos mesentéricos foram tratados com as concentrações plasmáticas dos fármacos anti-inflamatórios (Tabela 1 da metodologia), por 48 horas. Após o tratamento, foi realizada análise da viabilidade celular, utilizando o corante *trypan blue*. De uma forma geral, nenhuma alteração da viabilidade celular foi significativa em relação ao grupo veículo (DMSO) nas concentrações plasmáticas. Os fármacos piroxican e diclofenaco levaram a um leve aumento no número de células viáveis, enquanto que, naproxeno e AAS levaram a uma leve diminuição da quantidade de linfócitos viáveis (**Figura 1A**).

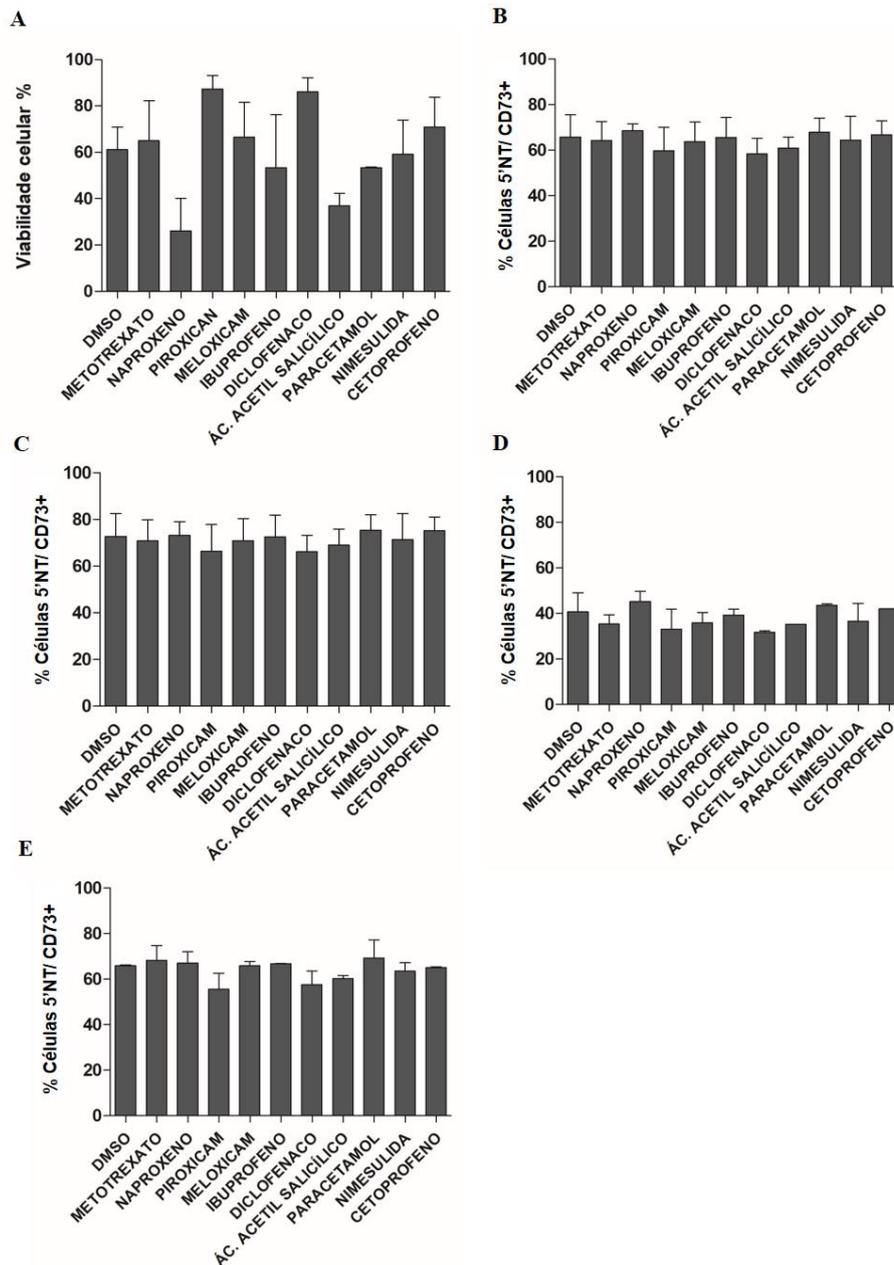
Foi realizada análise da expressão da 5'NT/CD73, por citometria de fluxo, nos linfócitos totais e nas sub populações: CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD4⁺CD25^{high}. Os resultados obtidos demonstram que nenhum dos fármacos, nas concentrações plasmáticas, alterou a expressão da enzima em comparação ao controle DMSO. Aproximadamente 60 % dos linfócitos totais (**Figura 1B**), 70% dos linfócitos CD3⁺CD4⁺ (**Figura 1C**), 40 % dos linfócitos CD3⁺CD8⁺ (**Figura 1D**) e 60 % de linfócitos CD4⁺CD25^{high} (**Figura 1E**) expressam a 5'NT/CD73 em suas superfícies, após tratamento com DMSO ou com as concentrações plasmáticas dos anti-inflamatórios.

5.2 Avaliação da viabilidade celular e expressão da 5'NT/CD73 após tratamento das células de GBM com anti-inflamatórios (concentrações plasmáticas)

Células de glioblastoma C6 foram semeadas em placas de 24 poços. Após atingirem confluência adequada, foram expostas as concentrações plasmáticas dos fármacos, por 48 horas. Posteriormente, foi realizada análise da viabilidade celular, utilizando o corante *trypan blue* e análise da expressão da 5'NT/CD73 por citometria de fluxo. Nas concentrações plasmáticas dos anti-inflamatórios, apenas o MTX reduziu significativamente a porcentagem de células C6 viáveis ($18,12 \pm 2,23$ % de células viáveis), em comparação ao controle DMSO ($109,00 \pm 12,79$ % de células viáveis) (**Figura 2A**). O tratamento com as concentrações plasmáticas dos AINEs, não

alterou a expressão da enzima 5'NT/CD73 nas células de GBM. Conforme previamente publicado por nós, o tratamento com MTX levou ao aumento da expressão da enzima (**Figura 2B**).

Figura 1. Tratamento de linfócitos mesentéricos com concentrações plasmáticas dos fármacos anti-inflamatórios por 48 horas.

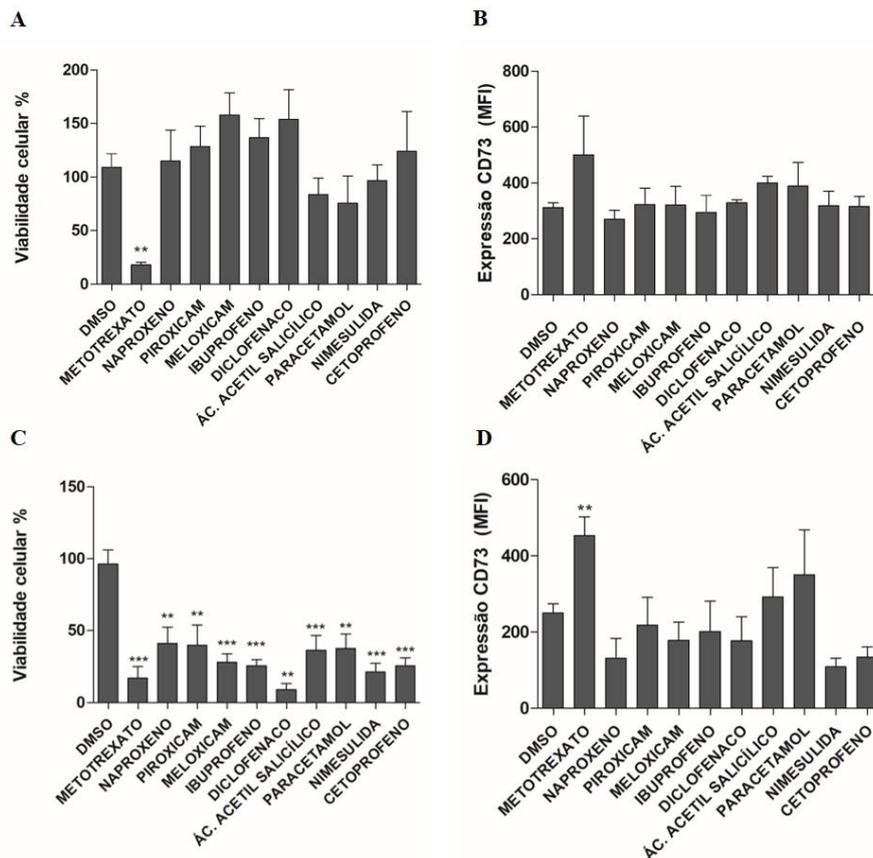


A viabilidade celular dos linfócitos foi analisada por contagem utilizando o corante trypan blue (**A**) (n=2). A expressão da 5'NT/CD73 em linfócitos totais (**B**), linfócitos CD3+CD4+ (**C**), linfócitos CD3+CD8+ (**D**) e linfócitos CD4+CD25+ (**E**), foi analisada por citometria de fluxo (n=2). Os resultados estão expressos como média \pm DP.

5.3 Avaliação da viabilidade celular e expressão da 5'NT/CD73 após tratamento das células de GBM com anti-inflamatórios (concentrações citotóxicas)

Considerando que as concentrações plasmáticas dos fármacos não levaram a redução da viabilidade celular (com exceção do MTX), avaliou-se a o efeito de concentrações citotóxicas sobre a expressão da 5'NT/CD73 em células de GBM. As concentrações citotóxicas utilizadas reduziram significativamente a viabilidade das células C6, em relação ao controle DMSO (**Figura 2C**). Os AINEs em estudo, em concentrações citotóxicas, não alteraram significativamente a expressão da enzima 5'NT/CD73 nas células de GBM. Somente o MTX levou a um aumento significativo da expressão da 5'NT/CD73 nas células C6 ($453,80 \pm 48,90$ MFI), em comparação ao controle DMSO ($250,30 \pm 24,47$ MFI) (**Figura 2D**).

Figura 2. Tratamento de células C6 com concentrações plasmáticas e citotóxicas dos fármacos anti-inflamatórios por 48 horas.



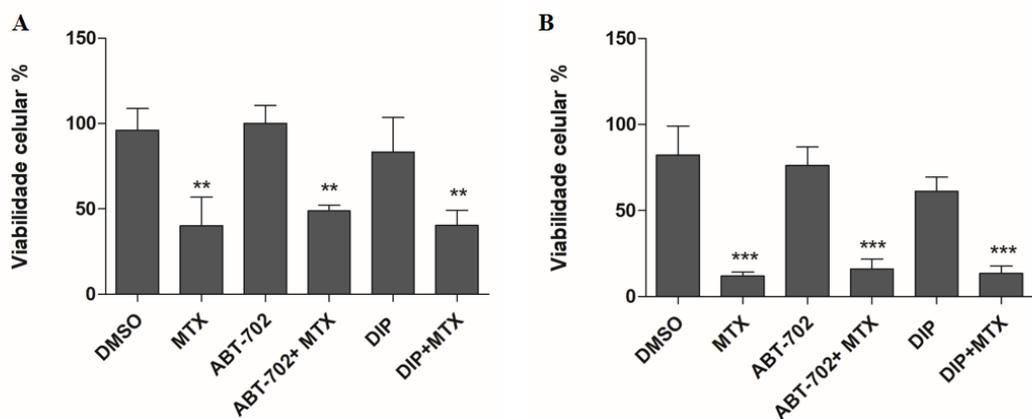
A viabilidade das células C6 tratadas com as concentrações plasmáticas (n=3) (**A**) e, com as concentrações citotóxicas dos fármacos (n=3) (**C**), foi analisada utilizando o corante de exclusão *trypan blue*. Analisou-se a expressão da 5'NT/CD73 nas células, após tratamento com concentrações plasmáticas (n=2) (**B**) e concentrações citotóxicas (n=4) (**D**) dos fármacos, por citometria de fluxo,

expressa em intensidade média de fluorescência (MFI, *mean fluorescence intensity*). Os resultados estão expressos como média \pm DP, $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

5.4 Avaliação do papel intracelular e extracelular da adenosina após tratamento com MTX

Células C6 foram tratadas com 0,1 μ M de ABT-702 (inibidor da adenosina cinase) e 10 μ M de DIP (inibidor do transportador de adenosina para o meio intracelular) na presença ou não de 1 μ M de MTX. Após 24 e 48 horas de exposição ao tratamento, foi realizada análise da viabilidade celular com *trypan blue*. O tratamento das células C6, somente com ABT-702 e DIP, por 24 e 48 horas, não alterou significativamente a porcentagem de células C6 viáveis, em comparação ao controle DMSO (**Figura 3**). O MTX, como já esperado, em ambos os tempos reduziu significativamente a viabilidade celular, em comparação ao controle DMSO. O tratamento com DIP e ABT-702, anterior a adição do MTX, não alterou o poder citotóxico do MTX sob as células de GBM (**Figura 3**).

Figura 3. Tratamento das células com ABT-702, DIP e MTX por 24 e 48 horas.

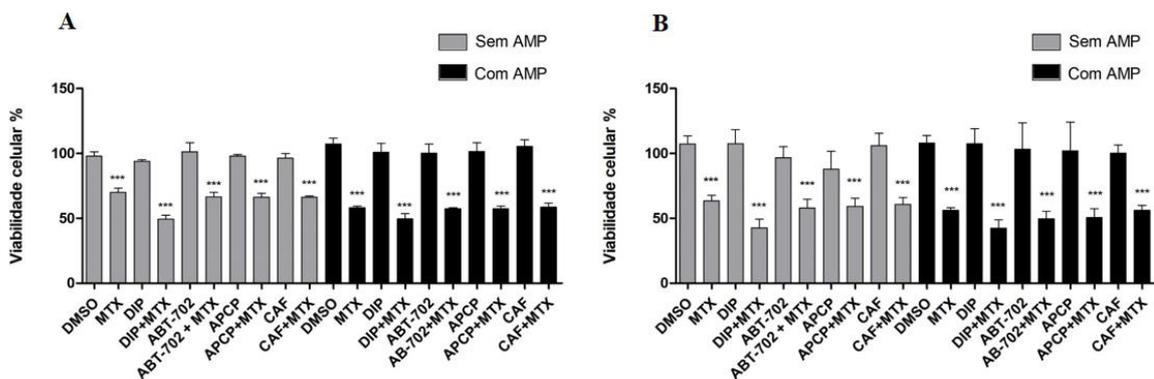


Células C6 foram tratadas com 1 μ M de MTX por 24 horas (n=3) (**A**) e 48 horas (n=3) (**B**), com ou sem a exposição prévia de 0,1 μ M de ABT-702 e 10 μ M de DIP. Foi realizada análise da viabilidade celular por contagem, com *trypan blue*. Os resultados estão expressos como média \pm DP, $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

Para confirmar os resultados do papel intracelular e avaliar o papel extracelular da adenosina após tratamento com MTX, células C6 cultivadas em placas de 96

poços, foram tratadas com 100 μM de ABT-702, 10 μM de APCP, 30 μM de cafeína e 5 μM de DIP, na presença ou não de 1 μM de MTX. Além disso, considerando que células tumorais estão expostas a concentrações maiores de adenosina extracelular em um microambiente tumoral, avaliou-se a influência da adição de 20 μM de AMP, substrato da enzima 5'NT/CD73, ao tratamento. Em estudos prévios, realizados pelo nosso laboratório, mostramos que células C6 superexpressam a enzima 5'NT/CD73 em suas superfícies (Bavaresco et al., 2008). Deste modo, ao adicionar excesso de AMP, a enzima 5'NT/CD73 (enzima que hidrolisa AMP a adenosina), geraria uma maior quantidade de adenosina no meio. Após 24 e 48 horas de tratamento, foi realizada análise da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTS. O MTX reduziu significativamente a viabilidade das células de GBM, em comparação ao controle DMSO. Nenhum dos inibidores testados alterou o efeito antiproliferativo do MTX, após 24 horas (**Figura 4A**) e 48 horas (**Figura 4B**) de tratamento. Não ocorreu diferença significativa na viabilidade das células, expostas a maiores concentrações de AMP, em comparação as células que não foram expostas a esse nucleotídeo de forma exógena (**Figura 4**).

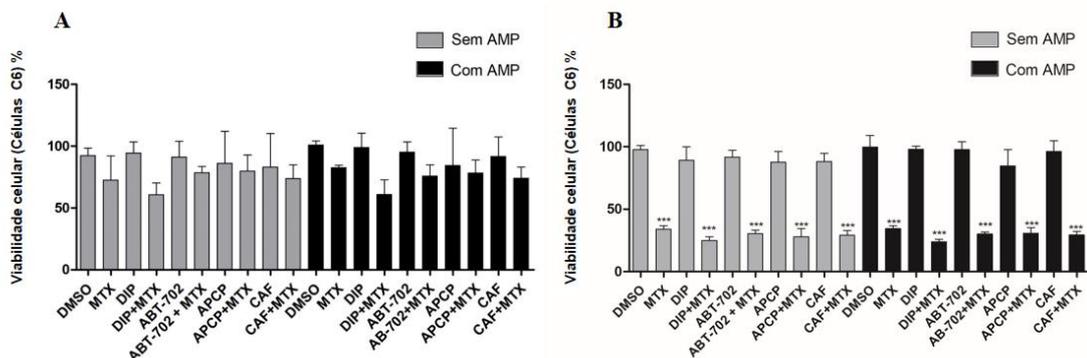
Figura 4. Tratamento de células C6 com os inibidores, MTX e AMP por 24 e 48 horas.



Análise das células de GBM C6 viáveis, pelo método MTS, após tratamento com 1 μM de MTX por 24 horas (**A**) e 48 horas (**B**), com ou sem exposição prévia de 5 μM de DIP; 0,1 μM de ABT-702; 10 μM de APCP e 30 μM de cafeína. Além disso, foi avaliado o efeito de 20 μM de AMP sobre o tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm DP de três experimentos independentes (n=3) realizados em duplicata, $p < 0,001$ (***).

Além disso, para tentar aproximar nosso modelo ao microambiente tumoral, foi avaliada a influência da co-cultura de células C6 com linfócitos mesentéricos, após o tratamento com os inibidores, MTX e AMP, por 24 e 48 horas. Após o tratamento, foi analisada a viabilidade das células C6 pelo método colorimétrico MTT. No tratamento de 24 horas, não ocorreu diminuição significativa da viabilidade das células, até mesmo das células expostas ao MTX (**Figura 5A**). Mostrando que a co-cultura com linfócitos, afetou o efeito antiproliferativo do MTX, pois, na mesma concentração e tempo de tratamento, o MTX reduziu significativamente a viabilidade das células C6 (**Figura 4**). Após 48 horas de exposição ao tratamento, o MTX reduziu significativamente a porcentagem de células C6 viáveis ($32,82 \pm 2,742$ % de células viáveis) em relação ao controle DMSO ($98,10 \pm 3,278$ % de células viáveis). O tratamento prévio da co-cultura com os inibidores, mais uma vez, não alterou o efeito antiproliferativo apresentado pelo MTX. A adição de AMP também não levou a alterações na viabilidade das células, nem mesmo na presença de linfócitos mesentéricos (**Figura 5B**).

Figura 5. Tratamento da co-cultura de células C6 e linfócitos mesentéricos com os inibidores, MTX e AMP por 24 e 48 horas.



Análise da viabilidade de células C6, pelo método MTT, após tratamento da co-cultura de células C6 e linfócitos periféricos. A co-cultura das células, foi tratada com $1\mu\text{M}$ de MTX por 24 horas ($n=3$) (**A**) e 48 horas ($n=4$) (**B**), com ou sem exposição prévia de $5\mu\text{M}$ de DIP, $0,1\mu\text{M}$ de ABT-702, $10\mu\text{M}$ de APCP e $30\mu\text{M}$ de cafeína. Além disso, foi avaliado o efeito de $20\mu\text{M}$ de AMP sobre o tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm DP, de experimentos independentes, realizados em duplicata, $p < 0,001$ (***)).

6. DISCUSSÃO

O glioblastoma multiforme é o tumor primário mais maligno e comum do SNC. Apesar dos intensos esforços, ainda não existe cura para esta neoplasia (Butowski et al., 2006). Diversos fatores contribuem com este quadro, incluindo: localização do tumor, alto grau de invasividade aos tecidos adjacentes, presença da BHE e alta complexidade histológica. Além disso, a baixa compreensão da fisiopatologia desta doença, é um dos fatores limitantes ao tratamento (Louis et al., 2007, Behin et al., 2003). A presença do infiltrado inflamatório no microambiente desta neoplasia está diretamente relacionado ao grau de malignidade (Watters et al., 2015).

Sabe-se que a inflamação proporciona um microambiente com condições favoráveis ao crescimento de GBM e de outras neoplasias. O papel de anti-inflamatórios, neste contexto, vem sendo amplamente investigado. Diversos fármacos anti-inflamatórios apresentaram potencial efeito antiproliferativo em modelos de neoplasias. Como exemplo o cetropofeno, um AINE não seletivo para COX-2, administrado na forma de nanocápsulas, reduziu o crescimento tumoral e, diminuiu as características malignas de GBM implantado em cérebros de ratos. Além disso, foi demonstrado que este fármaco, em solução ou em nanocápsulas, aumentou a atividade das E-NTPDases e diminuiu a atividade da adenosina deaminase, em linfócitos de ratos. Foi sugerido que a modulação dessas enzimas, pelo cetoprofeno, contribui com o aumento dos níveis de adenosina, e assim, pode estar contribuindo com a redução da inflamação relacionada ao câncer e, redução do crescimento tumoral (Silveira et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado o efeito de fármacos anti-inflamatórios no crescimento neoplásico e sua relação com o sistema adenosinérgico. Por exemplo, a indometacina, um AINE não seletivo para COX-2, apresentou efeito antiproliferativo em linhagens de GBM, relacionado ao aumento da expressão da enzima 5'NT/CD73 (Bernardi et al., 2007). A 5'NT/CD73 é a principal enzima responsável pela produção de adenosina no meio extracelular a partir dos nucleotídeos de adenina (Zimmermann, 2000). Desta forma, a hipótese apresentada, é que a indometacina, ao aumentar a expressão da 5'NT/CD73, gera um aumento da produção de adenosina no meio extracelular, a qual exerce seus efeitos via ligação a receptores A₃ (Bernardi et al., 2007). Além disso, a dexametasona, um anti-inflamatório da classe dos

corticosteroides, também reduziu o crescimento de células de GBM e aumentou a expressão da 5'NT/CD73 nestas células. Entretanto, nesse trabalho, não se demonstrou a relação entre aumento de adenosina e crescimento celular em termos de mecanismo (Bavaresco et al., 2007).

O MTX, na forma de nanocápsulas lipídicas (MTX-LNCs), reduziu o volume tumoral e aumentou a expressão da enzima 5'NT/CD73 em modelos de GBM implantados em cérebro de ratos. Foi verificado, que o aumento geral da expressão da 5'NT/CD73 no microambiente de GBM, é resultado do aumento da expressão desta enzima na superfície de células de GBM e também, nas superfícies de linfócitos CD3+CD4+ e CD3+CD8+. Mostrando que o aumento da expressão da 5'NT/CD73, em diferentes células do microambiente de GBM, pode levar a produção de elevados níveis de adenosina no tecido tumoral, que por sua vez, já possui concentrações supra-fisiológicas deste nucleosídeo (Figueiró, 2016; Wink et al., 2003). A hipótese apresentada é que o aumento dos níveis de adenosina, proporcionado pelo MTX, gera supressão das células do sistema imune presente no microambiente, incluindo os linfócitos T regulatórios, os quais, apresentam importante papel na progressão do GBM. Ao suprimir a ação dos linfócitos T regulatórios, outras células T efetoras poderiam estar sendo recrutadas para o combate do tumor. Contribuindo, pelo menos em parte, com a diminuição do tamanho tumoral vista após tratamento com MTX-LNCs (Figueiró et al., 2015; Figueiró et al., 2016).

Com base nessas informações, o presente estudo buscou avaliar a expressão da 5'NT/CD73, em células de GBM C6 e em linfócitos periféricos, após exposição ao MTX e anti-inflamatórios da classe dos não esteroidais (AINEs): naproxeno, piroxicam, meloxicam, ibuprofeno, diclofenaco de sódio, ácido acetil salicílico, paracetamol, nimesulida e cetoprofeno. O tratamento com os fármacos, em concentrações plasmáticas, não afetou a viabilidade dos linfócitos totais (Figura 1 A). Nem mesmo o MTX, um fármaco conhecido pela seu efeito antiproliferativo, foi capaz de reduzir a viabilidade dos linfócitos. Isso acontece porque o MTX atua principalmente em células que estão em crescimento exponencial, tais como as células de câncer (Huennekens et al., 1994). De fato, o tratamento com MTX reduziu significativamente a viabilidade das células de GBM C6. Os AINEs em suas concentrações plasmáticas não afetaram a viabilidade das células C6 (Figura 2 A).

Os fármacos anti-inflamatórios, em suas concentrações plasmáticas, não alteraram a expressão da enzima 5'NT/CD73, em células de GBM, assim como no total de linfócitos e subpopulações de linfócitos T (linfócitos CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD4⁺CD25^{high}) (Figura 1 e 2A). Nos estudos prévios, o MTX, em nanocápsulas lipídicas, aumentou a expressão da 5'NT/CD73 na superfície dos linfócitos do microambiente tumoral (Figueiró et al., 2016). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo *in vitro*, mostraram que o MTX não modulou a expressão da enzima 5'NT/CD73 na superfície dos linfócitos periféricos (Figura 1).

Levando em consideração que as concentrações plasmáticas dos AINES não diminuíram significativamente o crescimento das células C6 após tratamento e que nos estudos prévios sobre a indometacina e dexametasona a alteração da expressão da 5'NT/CD73 em células de GBM foi verificada nas concentrações citotóxicas dos fármacos, buscamos avaliar o efeito das concentrações citotóxicas dos fármacos anti-inflamatórios na expressão da 5'NT/CD73 em células de GBM C6. O tratamento com as concentrações citotóxicas destes fármacos reduziu o crescimento de células de GBM C6, entretanto, nenhum fármaco, além do MTX, foi capaz de alterar significativamente a expressão da enzima 5'NT/CD73 (Figura 2D).

O aumento dos níveis de adenosina pelo MTX é amplamente investigado. Sabe-se que o efeito anti-inflamatório do MTX está relacionado ao aumento deste nucleosídeo no meio extracelular (Cronstein et al., 1993). A adenosina extracelular se liga aos receptores de adenosina P1 (receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃) desempenhando uma série de efeitos intracelulares. A ligação aos receptores P1 está relacionada a regulação da inflamação e imunossupressão (Montesinos e Crostein, 2001; Bavaresco et al. 2008). Foi demonstrado que os receptores A_{2A} e A₃ são requeridos para o efeito anti-inflamatório do MTX em modelo *in vivo* de artrite reumatoide. Mostrando que o aumento dos níveis de adenosina, gerado pelo MTX, exerce importante papel via ligação aos receptores adenosinérgicos P1 (Montesinos et al., 2003).

O presente estudo buscou entender o papel do sistema adenosinérgico sobre o efeito citotóxico do MTX em células de GBM C6. Primeiramente, buscamos avaliar o papel da adenosina intracelular sobre o efeito antiproliferativo do MTX. Para isso, tratamos as células C6 com dipiridamol (inibidor do transportador de nucleosídeos, incluindo a adenosina, para o meio intracelular) e ABT-702 (inibidor da adenosina

cinase) 30 minutos antes da exposição ao MTX. O objetivo de associar DIP ou ABT-702 ao tratamento com MTX, era avaliar se os inibidores reverteriam, pelo menos em parte, o efeito citotóxico do MTX.

O tratamento das células com DIP, ao bloquear a captação de adenosina para o meio intracelular, permite avaliar o papel da adenosina intracelular (adenosina captada) sobre a morte das células tumorais. Consequentemente, esta inibição leva ao aumento dos níveis de adenosina no meio extracelular (Wang et al., 2013). O tratamento das células de GBM somente com DIP não alterou a viabilidade das células. A exposição das células a DIP, 30 minutos antes do tratamento com MTX, não alterou significativamente o efeito citotóxico do fármaco. Esses resultados mostram que o efeito citotóxico do MTX em células de GBM C6 não está relacionado a captação de adenosina pelas células, nas condições experimentais testadas.

A conversão intracelular de adenosina a AMP pela adenosina cinase é uma reação enzimática fundamental para o controle dos níveis de adenosina (Boison, 2013). A inibição da adenosina cinase, pelo ABT-702, demonstrou reduzir o estado inflamatório em modelo de artrite reumatoide. A hipótese apresentada é que o efeito anti-inflamatório visto é relacionado ao aumento de adenosina no meio extracelular e ligação da adenosina aos receptores de adenosina P1 (Boyle et al., 2000). O aumento de adenosina no meio intracelular, pela inibição da adenosina cinase, pode levar ao aumento de adenosina no meio extracelular através de gradiente de concentração e/ou exocitose (Morabito et al., 1998). No contexto de neoplasias o papel da adenosina cinase depende do tipo de neoplasia (Tsuchiya et al., 2012). Estudos realizados em células de câncer de mama e células de câncer cervical, demonstraram que os efeitos citotóxicos da adenosina podem estar relacionados a conversão de adenosina a AMP (pela adenosina cinase), sendo esta conversão, uma das etapas que levam a ativação da via apoptótica (Hashemi et al., 2005; Mello et al., 2014). Deste modo, o tratamento das células de GBM C6 com ABT-702, 30 minutos antes da exposição ao MTX, poderia diminuir a porcentagem de células que sofrem apoptose, e assim reduzir, pelo menos em parte, o efeito antiproliferativo do MTX. Entretanto, o tratamento prévio com ABT-702 não gerou nenhuma diferença significativa no efeito citotóxico do fármaco, mostrando não agir por esse mecanismo molecular (Figura 3).

Para confirmação dos resultados obtidos em relação ao papel intracelular da adenosina e, para avaliação do papel extracelular da adenosina sobre o efeito

citotóxico do MTX, células C6 foram tratadas com DIP, ABT-702, APCP (inibidor competitivo da ecto-5'-nucleotidase/CD73), da cafeína (antagonista não seletivo dos receptores P1 de adenosina) em associação ou não com MTX. Outra variável nesse experimento foi a avaliação do efeito da adição de 20 μ M de AMP ao tratamento. O AMP é rapidamente degradado a adenosina em células de GBM C6, devido à alta expressão da enzima 5'NT/CD73 na superfície destas células, como demonstrado previamente pelo nosso grupo (Figueiró et al., 2016; Bavaresco et al., 2008).

As metilxantinas, encontradas em diversos medicamentos e alimentos, são conhecidas por antagonizar, de forma não seletiva, os receptores de adenosina (Stiles, 1997). Dentre elas, a teofilina, descrita como antagonista dos receptores A₁, A_{2A} e A_{2B} e, a cafeína, descrita como antagonista de todos receptores de adenosina (antagonista não seletivo dos receptores P1 de adenosina) (Ji et al., 1994; Jacobson e Rhee, 1997). Ambas metilxantinas, demonstraram reduzir a atividade anti-inflamatória do MTX, em um estudo realizado *in vivo* de artrite reumatoide. Isoladamente, a teofilina e a cafeína não causaram nenhuma mudança significativa no estado inflamatório (Montensinos et al., 2000). No presente estudo, o tratamento das células C6 com cafeína não afetou a viabilidade das células C6. Além disso, a cafeína não alterou o efeito antiproliferativo do MTX, mostrando que, a inibição não seletiva dos receptores de adenosina P1 (receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃), não altera o efeito citotóxico do MTX (Figura 4). Em outras palavras, na condição testada, os resultados demonstram que a inibição do crescimento das células neoplásicas C6 não está relacionada a ligação da adenosina aos seus receptores, na superfície destas células.

O aumento da adenosina no meio extracelular, promovido pelo MTX, está vinculado a hidrólise dos nucleotídeos de adenina no meio extracelular. Montesinos et al. (2007) demonstraram que camundongos deficientes da enzima 5'NT/CD73, apresentaram menores níveis de adenosina após tratamento com MTX, em comparação aos camundongos do tipo selvagem (camundongos não deficientes de 5'NT/CD73). Tendo em vista que a 5'NT/CD73 é a principal enzima responsável pela regulação dos níveis de adenosina no meio extracelular, o tratamento das células com APCP pode levar a uma redução dos níveis de adenosina no meio extracelular. Em modelo de inflamação, o tratamento com APCP reverteu o efeito anti-inflamatório apresentado pelo MTX (Morabito et al., 1998). No presente estudo, o tratamento das células de GBM C6 com APCP, e possível redução de adenosina no meio, não alterou

o efeito citotóxico do MTX, após 24 e 48 horas de tratamento (Figura 4). O tratamento das células de GBM C6 somente com APCP não reduziu a viabilidade das células C6 de GBM.

O tratamento com AMP, como já citado, poderia aumentar ainda mais os níveis de adenosina no meio extracelular. Entretanto, o tratamento com AMP isoladamente ou após 30 minutos ao tratamento com DIP, ABT-702, APCP e MTX, não alterou significativamente a viabilidade das células (Figura 4), mostrando que a adição exógena de AMP, e conversão à adenosina ao meio, não altera o efeito citotóxico do MTX.

Estudos *in vitro* utilizando somente células neoplásicas, possuem grandes limitações, por não representarem a complexidade de um microambiente neoplásico. O microambiente de GBM é composto por grande variedade histológica, apresentando variados tipos celulares, incluindo células neoplásicas em proliferação e células do sistema imune, tais como os macrófagos e os linfócitos (Solinas et al., 2009; Balkwill e Coussens, 2004). Com base nisso, tentamos aproximar nosso modelo de estudo ao microambiente tumoral, através da co-cultura das células C6 com linfócitos periféricos. As condições experimentais eram iguais ao do experimento anterior (experimento 4.6 da metodologia), com exceção da adição dos linfócitos. Desta forma, foi possível comparar o efeito da co-cultura sobre a viabilidade das células, após o tratamento com DIP, APCP, ABT-702, AMP, cafeína e MTX. Vimos que após 24 horas de tratamento, o MTX e inibidores, não reduziram significativamente a viabilidade das células C6, que foram cultivadas juntamente com linfócitos. Mostrando que após 24 horas, os linfócitos modularam este microambiente (Figura 5A). De fato, a presença de grande heterogeneidade celular no microambiente de GBM é um dos fatores relacionados a falha terapêutica. Os fármacos muitas vezes se tornam ineficazes, devido a presença de células do sistema imune que são moduladas por um fenótipo pró-tumoral, resultando em um complexo sistema proliferativo desenvolvido pelo tumores (Nieto-Sampedro et al., 2011; Wen e Kesari, 2008). Isso pode explicar, pelo menos em parte, o motivo pelo qual o MTX não reduziu a viabilidade das células C6 após 24 horas. Entretanto, após um tempo mais prolongado (48 horas de tratamento), o MTX foi capaz de reduzir significativamente as células C6 viáveis (Figura 5B). A adição de fonte exógena de AMP também não alterou a viabilidade das células de GBM (Figura 5).

7. CONCLUSÃO

O objetivo inicial do presente estudo era avaliar a possível modulação de fármacos anti-inflamatórios, incluindo o MTX e representantes da classe dos AINEs, na expressão da enzima 5'NT/CD73 em células de GBM. Entretanto, nenhum fármaco, além do MTX, demonstrou modular a enzima nas células de GBM. Com base nesses resultados e nos resultados obtidos previamente pelo nosso grupo, decidimos aprofundar o mecanismo adenosinérgico sobre o efeito citotóxico do MTX.

Os resultados obtidos foram contrários a hipótese apresentada pelo nosso grupo. A hipótese, como já mencionada, era que o efeito citotóxico apresentado pelo MTX poderia estar diretamente relacionado ao aumento de adenosina no meio extracelular, através do aumento da expressão da enzima 5'NT/CD73 nas células neoplásicas e, em células do sistema imune presente no microambiente do GBM (Figueiró et al., 2016).

Entretanto, o bloqueio da captação de adenosina para o meio intracelular (utilizando DIP); a inibição da possível via de apoptose (via inibição da adenosina cinase intracelular, utilizando ABT-702); o aumento de adenosina no meio extracelular (pelo tratamento com DIP e ABT-702 ou pela fonte exógena de AMP); a diminuição da produção de adenosina no meio extracelular (pela inibição da enzima 5'NT/CD73, utilizando APCP); e inibição da ligação da adenosina aos seus receptores P1, incluindo o receptor adenosinérgico A₃ (utilizando a cafeína), não provocaram diferenças significativas no efeito antiproliferativo do MTX. Mostrando que, nas condições testadas, o sistema adenosinérgico não exerce efeitos diretos na citotoxicidade desencadeada pelo MTX em células de GBM C6.

Desta forma, são necessários maiores estudos para entender o papel do sistema adenosinérgico e do MTX no crescimento de GBM, incluindo estudos em modelo de GBM *in vivo*, pois, como já demonstrado pelo grupo, o MTX pode estar modulando diversas células do microambiente tumoral e que indiretamente pode estar modulando o crescimento do GBM. Portanto, considerando o presente estudo e os estudos prévios do nosso grupo, a principal perspectiva desse trabalho é entender o mecanismo pelo qual o MTX modula linfócitos Treg *in vivo* e a relação dessa modulação para o crescimento tumoral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBESIANO, Emilia; HAN, James E.; LIM, Michael. Mechanisms of Local Immunoresistance in Glioma. **Neurosurgery Clinics Of North America**, v. 21, n. 1, p.17-29, jan. 2010.

ALBINI, Adriana et al. Tumor Inflammatory Angiogenesis and Its Chemoprevention. **Cancer Research**, v. 65, n. 23, p.10637-10641, 1 dez. 2005.

ALDAPE, Kenneth et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 6, p.829-848, 6 maio 2015.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância sanitária. **Preços máximos de medicamentos por princípio ativo**, de 21 de novembro de 2017, disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/374947/2829072/LISTA+CONFORMIDADE_2017-11-21.pdf/0eb8be77-d218-4494-a0c5-4415bfd35193 > acessado em 17 de dezembro de 2017.

BAEK, S. J.. Dual Function of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Inhibition of Cyclooxygenase and Induction of NSAID-Activated Gene. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 301, n. 3, p.1126-1131, 1 jun. 2002.

BAGGOT, J.E.; MORGAN, S.L.; VAUGHN, W.H. Differences in methotrexate and 7-hydroxymethotrexate inhibition of folate-dependent enzymes of purine nucleotide biosynthesis. **Biochemical Journal**, v.300, p.627–629, Jun, 1994.

BAKKER, Winston W. et al. Plasma Hemopexin Activity in Pregnancy and Preeclampsia. **Hypertension In Pregnancy**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.227-239, jan. 2007

BALKWILL, Fran; COUSSENS, Lisa M.. Cancer: An inflammatory link. **Nature**, v. 431, n. 7007, p.405-406, 23 set. 2004.

BASTID, J et al. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. **Oncogene**, v. 32, n. 14, p.1743-1751, 2 jul. 2012.

BATLOUNI, Michel. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo , v. 94, n. 4, p. 556-563, Apr. 2010.

BAVARESCO, Luci et al. Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity in C6 rat glioma cell line. **Journal Of Neuro-oncology**, v. 84, n. 1, p.1-8, 24 abr. 2007.

BAVARESCO, Luci et al. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 319, n. 1-2, p.61-68, 18 jul. 2008.

BEHIN, Anthony et al. Primary brain tumours in adults. **The Lancet**, , v. 361, n. 9354, p.323-331, jan. 2003.

BERNARDI, Andressa et al. Indomethacin stimulates activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell lines. **European Journal Of Pharmacology**, v. 569, n. 1-2, p.8-15, ago. 2007.

BLACKBURN, Michael R. et al. Adenosine Receptors and Inflammation. **Adenosine Receptors In Health And Disease**, p.215-269, 2009.

BLEEHEN, Nm; STENNING, Sp. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. **British Journal Of Cancer**, v. 64, n. 4, p.769-774, out. 1991.

BOISON, D.. Adenosine Kinase: Exploitation for Therapeutic Gain. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 3, p.906-943, 16 abr. 2013.

BORSELLINO, G. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, v. 110, n. 4, p.1225-1232, 15 ago. 2007.

BOYLE, David L. et al. Anti-inflammatory effects of ABT-702, a novel non-nucleoside adenosine kinase inhibitor, in rat adjuvant arthritis. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, v.296, n.2, p.495-500, Fev.2001.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **PORTARIA Nº 35, DE 26 DE SETEMBRO DE 2014**. Brasília, DF, 2014.

BURNSTOCK, Geoffrey. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 3, p.166-176, mar. 2006 (b).

BURNSTOCK, Geoffrey. Introduction to the Special Issue on Purinergic Receptors. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, 2017.

BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic signaling: an overview. **Novartis Foundation Symposium**, v.276,p.26-48, 2006 (a).

BURNSTOCK, Geoffrey.. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p.1471-1483, 19 mar. 2007.

BURNSTOCK, Geoffrey; BOEYNAEMS, Jean-marie. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, , v. 10, n. 4, p.529-564, 29 out. 2014.

BUTLER, Matt et al. Impairment of adenosine A3 receptor activity disrupts neutrophil migratory capacity and impacts innate immune function in vivo. **European Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 42, n. 12, p.3358-3368, 12 nov. 2012.

BUTOWSKI, Nicholas A.; SNEED, Patricia K.; CHANG, Susan M.. Diagnosis and Treatment of Recurrent High-Grade Astrocytoma. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 24, n. 8, p.1273-1280, 10 mar. 2006.

CATELLA-LAWSON, Francesca et al. Cyclooxygenase Inhibitors and the Antiplatelet Effects of Aspirin. **New England Journal Of Medicine**, v. 345, n. 25, p.1809-1817, 20 dez. 2001.

COOPER, Itzik et al. Combined Local Blood–Brain Barrier Opening and Systemic Methotrexate for the Treatment of Brain Tumors. **Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 35, n. 6, p.967-976, 11 fev. 2015.

COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p.860-867, 19 dez. 2002.

CRONSTEIN, B N; NAIME, D; OSTAD, e. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 92, n. 6, p.2675-2682, 1 dez. 1993.

CRONSTEIN, B. N.. Low-Dose Methotrexate: A Mainstay in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 2, p.163-172, 1 jun. 2005.

CROSTEIN, B.N et al. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. **Journal of Immunology** , v.148,n.7,p. 2201–2206,1992.

CRYER, Bryon; FELDMAN, Mark.Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs.**The American Journal of Medicine**. V.104, n.5,p.413-421, May.1998.

DOUTHWAITE, A.H; LINOTT,S.A.M. Gastroscopic observation of the effect of aspirin and certain other substances on the stomach. **Lancet**.,2, p.1222–1225, 1998.

DUBOIS, R. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **The FASEB Journal**,v.12, p.1063-1088, 1998.

ERNST, P. B.; GARRISON, J. C.; THOMPSON, L. F.. Much Ado about Adenosine: Adenosine Synthesis and Function in Regulatory T Cell Biology. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 185, n. 4, p.1993-1998, 4 ago. 2010.

FAAS, M.m.; SÁEZ, T.; VOS, P. de. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses?. **Molecular Aspects Of Medicine**, v. 55, p.9-19, jun. 2017.

FIGUEIRÓ, Fabrício et al. Methotrexate up-regulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 and reduces the frequency of T lymphocytes in the glioblastoma microenvironment. **Purinergic Signalling**, v. 12, n. 2, p.303-312, 24 fev. 2016.

FIGUEIRÓ, Fabrício et al. Pharmacological Improvement and Preclinical Evaluation of Methotrexate-Loaded Lipid-Core Nanocapsules in a Glioblastoma Model. **Journal Of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 10, p.1808-1818, 1 out. 2015.

FITZGERALD, Garret A. et al. Increased Prostacyclin Biosynthesis in Patients with Severe Atherosclerosis and Platelet Activation. **New England Journal Of Medicine**, v. 310, n. 17, p.1065-1068, 26 abr. 1984.

FITZGERALD, Garret A.; PATRONO, Carlo. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. **New England Journal Of Medicine**, v. 345, n. 6, p.433-442, 9 ago. 2001.

FRÖLICH, J.C. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 1, p.30-34, jan. 1997.

GALLUCCI, Stefania; MATZINGER, Polly. Danger signals: SOS to the immune system. **Current Opinion In Immunology**, v. 13, n. 1, p.114-119, fev. 2001.

GENÉ, Emily et al. Recommendations for the use of anti-inflammatory drugs and indications for gastrointestinal protection in emergency departments. **Emergencias**, v.21 p.295-300, 2009.

GESSI, Stefania et al. Adenosine receptor targeting in health and disease. **Expert Opinion On Investigational Drugs**, v. 20, n. 12, p.1591-1609, 22 out. 2011.

GRIM, J.; CHLÁDEK, J.; MARTÍNKOVÁ, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methotrexate in Non-Neoplastic Diseases. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 2, p.139-151, 2003.

GRUBBS, Clinton J. et al. Celecoxib inhibits N-butyl-N-(4- hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1mice and female Fischer-344 rats. **Cancer Research**, v.60, n.20, p.5599–5602, Out 2000.

HAN, S et al. Tumour-infiltrating CD4+ and CD8+ lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. **British Journal Of Cancer**, v. 110, n. 10, p.2560-2568, 1 abr. 2014.

HASHEMI, M. et al. Adenosine and deoxyadenosine induces apoptosis in oestrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cells via the intrinsic pathway. **Cell Proliferation**, v. 38, n. 5, p.269-285, out. 2005.

HIPPISLEY-COX, J.. Risk of adverse gastrointestinal outcomes in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: population based nested case-control analysis. **Bmj**, v. 331, n. 7528, p.1310-1316, 3 dez. 2005.

HOLLAND, Eric C.. Progenitor cells and glioma formation. **Current Opinion In Neurology**, v. 14, n. 6, p.683-688, 14 dez. 2001.

HUENNEKENS, F.M. The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. *Advances in enzyme regulation*, v. 34, p.397-419, 1994.

HUNCHAREK, M.; MUSCAT,J.; GESCHWIND,J.F. Multi-drug versus single agent chemotherapy for high grade astrocytoma; results of a meta-analysis. **Anticancer research**, v.18, n.6B, p.4693-4697 , Nov-Dec,. 1998.

HWANG, Daniel et al. Expression of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 in Human Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 6, Mar, 1998.

JACOBSON, K.A Adenosine A3 receptors: novel ligands and paradoxical effects. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.19,p.184-191, 1998.

JACOBSON, K.A.; RHEE, A.M. Development of selective purinoceptor agonists and antagonists. In: Jacobson KA, Jarvis MF, editors. *Purinergic approaches in experimental therapeutics*. New York: Wiley-Liss; p. 101–28, 1997.

JANA, N. R.. NSAIDs and apoptosis. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 65, n. 9, p.1295-1301, 23 fev. 2008.

JI, X.; GALLO-RODRUGUEZ, C.; JACOBSON, K.A.A SELECTIVE AGONIST AFFINITY LABEL FOR A₃ ADENOSINE RECEPTORS. **Biochemical and biophysical research communications**, v.203, n. 1, p.570-576, 1994.

LANAS, Angel; SCHEIMAN, James. Low-dose aspirin and upper gastrointestinal damage: epidemiology, prevention and treatment. **Current Medical Research And Opinion**, v. 23, n. 1, p.163-173, 14 dez. 2006.

LATINI, Serena; PEDATA, Felicita. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal Of Neurochemistry**, v. 79, n. 3, p.463-484, 7 jul. 2008. LECLERC, B. G. et al. CD73 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 1, p.158-166, 7 ago. 2015. American Association for Cancer Research (AACR).

LESNEY, M.S. Three paths to Novartis. **Mod Drug Discovery**, v.7.p.19–20, 2004.

LOI, S. et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 110, n. 27, p.11091-11096, 17 jun. 2013. Proceedings of the

LOUIS, David N. et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p.97-109, 6 jul. 2007.

LOUIS, David N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p.803-820, 9 maio 2016.

MACLAGAN, T.. The Treatment of Rheumatism by Salicin and Salicylic Acid. **Bmj**, v. 1, n. 803, p.627-627, 20 maio 1876.

MCGUIRE, J.J. Anticancer antifolates: current status and future directions. **Current Pharmaceutical Design.**, v.19, n.31, p.2593-613, 2003.

MELLO, P. D. A. et al. Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. **Molecular Biology Of The Cell**, v. 25, n. 19, p.2905-2918, 7 ago. 2014.

Micromedex® Healthcare Series [Internet database]. Greenwood Village, Colo: Thomson Healthcare. Atualizado periodicamente

MONTESINOS, M. Carmen et al. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: Evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 3, p.656-663, mar. 2000.

MONTESINOS, M. Carmen et al. The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: Findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 5, p.1440-1445, 2007.

MONTESINOS, M.Carmem.; CROSTEIN. Bruce. Montesinos MC, Cronstein Bruce. Role of P1 receptors in inflammation.In: Abbracchio MP, Williams M, editors. **Handbook of experimental pharmacology**. Vol. 151/II: Purinergic and pyrimidinergic signalling II. Cardiovascular, respiratory, immune, metabolic and gastrointestinal tract function. Berlin: Springer-Verlag; p. 303–21, 2001.

MORABITO, L et al. Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p.295-300, 15 jan. 1998.

MOUSSEAU, Mireille et al. A study of the expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumours. **European Journal of Cancer**, v.29,p.753-759, 1993.

NAVAS-ACIÉN, Ana et al. Interactive Effect of Chemical Substances and Occupational Electromagnetic Field Exposure on the Risk of Gliomas and Meningiomas in Swedish Men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**, v. 12, n. 11, p.1678-1683, 11 dez. 2002.

NIETO-SAMPEDRO, Manuel et al. Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune System. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 5, p.265-314, jan. 2011.

OH, Hoon Kyu et al. Overexpression of CD73 in epithelial ovarian carcinoma is associated with better prognosis, lower stage, better differentiation and lower regulatory T cell infiltration. **Journal Of Gynecologic Oncology**, v. 23, n. 4, p.274-281, 2012. Asian Society of Gynecologic Oncology; Korean Society of Gynecologic Oncology and Colposcopy (KAMJE).

OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Science**, v. 100, n. 12, p.2235-2241, dez. 2009.

OHTA, A. et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 103, n. 35, p.13132-13137, 17 ago. 2006.

PAIRET, M.; VAN RYN, J. Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Inflammation Research**, v.47, p.93-101, Out 1998.

PERRY, Arie; WESSELING, Pieter. Histologic classification of gliomas. **Handbook Of Clinical Neurology**, p.71-95, 2016.

PURCELL, W.T; ETTINGER, D.S. Novel antifolate drugs. **Current oncology reports**, v.5, n.2, p.114-125, mar 2003.

RAINSFORD, K.D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. **Subcell Biochemistry**;v.42, p.42:3-27, 2007.

RALEVIC, Vera; BURNSTOCK, Geoffrey. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews** , v.50, n.3, p.413-492 , Set 1998.

RAO, P; Knaus E.E.. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **Journal Of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p.81-110, 20 set. 2008.

RAYBURN, Elizabeth. Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy. **Molecular And Cellular Pharmacology**, v. 1, n. 1, p.29-43, 10 fev. 2009.

RODRÍGUEZ, G Luis Alberto., HERNÁNDEZ-DÍAZ, Sonia. Upper gastrointestinal complications among users of paracetamol. **Epidemiology**, v. 12, n. 5, p.570-576, set. 2001.

RYAN, L et al. Adenosine triphosphate levels in human plasma. **The Journal of Rheumatology**, v.23, n.2, p.214-219, 1996.

SAWAOKA, H. et al. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduced tumor growth in vivo. **Laboratory Investigation**. , v.79, n.12, p.1469–1477, dez 1999.

SAYOUR, Elias J. et al. Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 64, n. 4, p.419-427, 3 jan. 2015.

SCHERER, Emilene B. S. et al. Chronic mild hyperhomocysteinemia alters ectonucleotidase activities and gene expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in rat lymphocytes. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 362, n. 1-2, p.187-194, 2 nov. 2011.

SCHNEIDER, Thomas et al. Gliomas in Adults. **Deutsches Aerzteblatt Online**, v. 107, n. 45, p.799-807, 12 nov. 2010

SHIRAHAMA, Tsutomu. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder. *Clinical cancer research*, v.6, n.6, p.2424-2430, Jun 2000.

SILVEIRA, Elita F. da et al. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. **Investigational New Drugs**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.1424-1435, 27 set. 2013.

SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p.1065-1073, 9 set. 2009.

STILES, G.L. Adenosine receptor subtypes: new insights from cloning and functional studies. In: Jacobson KA, Jarvis MF, editors. **Purinergic approaches in experimental therapeutics**. New York: Wiley-Liss;. p. 29–38, 1997.

STUPP, Roger et al. Chemoradiotherapy in Malignant Glioma: Standard of Care and Future Directions. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 25, n. 26, p.4127-4136, 10 set. 2007.

STUPP, Roger et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal Of Medicine**, v. 352, n. 10, p.987-996, 10 mar. 2005.

TEGEDER, I. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p.2057-2072, 1 out. 2001.

THUN, M. J.; HENLEY, S.J.; PATRONO, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. **Journal of the National Cancer Institute**, v.94, n.4, p.252-266, fev, 2002.

TSAO, May N. et al. The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma. **International Journal Of Radiation Oncology*biology*physics**, v. 63, n. 1, p.47-55, set. 2005.

TSITLAKIDIS, Abraham et al. Biopsy versus resection in the management of malignant gliomas: a systematic review and meta-analysis. **Journal Of Neurosurgery**, v. 112, n. 5, p.1020-1032, maio 2010.

TSUCHIYA, Ayako et al. Intracellularly transported adenosine induces MCF-7 human breast cancer cells by accumulating AMID in the nucleus. **Cancer Letters**, v. 321, n. 1, p.65-72, ago. 2012.

UMANS, Robyn A.; SONTHEIMER, Harald. Combating malignant astrocytes: Strategies mitigating tumor invasion. **Neuroscience Research**, p.30552-30557, out. 2017.

VAN MEIR, E. G. et al. Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 3, p.166-193, 1 maio 2010.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. **International Journal of tissue reactions**, v.20, n.1, p.3-15, 1998.

VECCHIO, E. A. et al. Ligand-Independent Adenosine A2B Receptor Constitutive Activity as a Promoter of Prostate Cancer Cell Proliferation. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 357, n. 1, p.36-44, 20 jan. 2016.

WALUM, E.; STRENBORG, K.; JENSSEN, D. Understanding cell toxicology: principles and practice. NewYork: Ellis Howood, p. 97-111, 1990.

WANG et all. Dipyridamole analogs as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the

adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4). **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n.11, p. 1531-1540,dez 2013.

WANG, H.. Pretreatment with Dexamethasone Increases Antitumor Activity of Carboplatin and Gemcitabine in Mice Bearing Human Cancer Xenografts: In Vivo Activity, Pharmacokinetics, and Clinical Implications for Cancer Chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 5, p.1633-1644, 1 mar. 2004.

WANG, Hui et al. Dexamethasone as a chemosensitizer for breast cancer chemotherapy: Potentiation of the antitumor activity of adriamycin, modulation of cytokine expression, and pharmacokinetics. **International Journal Of Oncology**, v. 30, n. 4, p.947-953, 1 abr. 2007.

WANG, Rong et al. Prognostic value of CD73-adenosinergic pathway in solid tumor: A meta-analysis and systematic review. **Oncotarget**, v. 8, n. 34, p.57327-57336, 21 ago. 2017.

WATTERS, Jyoti J.; SCHATNER, Jill M.; BADIE, Behnam. Microglia function in brain tumors. **Journal Of Neuroscience Research**, v. 81, n. 3, p.447-455, 1 ago. 2005.

WEINBLATT, Michael E. et al. Efficacy of Low-Dose Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. **New England Journal Of Medicine**, v. 312, n. 13, p.818-822, 28 mar. 1985.

WEN, Patrick Y.; KESARI, Santosh. Malignant Gliomas in Adults. **New England Journal Of Medicine**, v. 359, n. 5, p.492-507, 31 jul. 2008.

WILLIAMS, Christopher S. et al. Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models. **Cancer Research**, v.60, n.21, p.6045-6051, nov 2000.

WINK, Marcia R et al. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. **Cancer Letters**, v. 198, n. 2, p.211-218, ago. 2003.

WITSCHI, Hanspeter et al. The Chemopreventive Effects of Orally Administered Dexamethasone in Strain A/J Mice Following Cessation of Smoke Exposure. **Inhalation Toxicology**, v. 17, n. 2, p.119-122, jan. 2005.

WOLFF, Johannes E. et al. High dose methotrexate for pediatric high grade glioma: results of the HIT-GBM-D Pilot study. *Journal Of Neuro-oncology*, v. 102, n. 3, p.433-442, 8 ago. 2010.

WU, Xian-rui et al. High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. ***Journal Of Surgical Oncology***, v. 106, n. 2, p.130-137, 27 jan. 2012

XU, Shuo et al. Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. ***Neuro-oncology***, v. 15, n. 9, p.1160-1172, 4 jun. 2013

ZAREK, P. E. et al. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. ***Blood***, v. 111, n. 1, p.251-259, 1 out. 2007.

ZHANG, B.. CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. ***Cancer Research***, v. 70, n. 16, p.6407-6411, 3 ago. 2010.

ZIMMERMANN, Herbert. Extracellular ATP and other nucleotides—ubiquitous triggers of intercellular messenger release. ***Purinergic Signalling***, v. 12, n. 1, p.25-57, 6 nov. 2015.

ZIMMERMANN, Herbert. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. ***Naunyn-Schmiedebergs' Archives of Pharmacology***, v.362, p.299–309, 2000.

ZLOTNIK, Albert. Involvement of Chemokine Receptors in Organ-Specific Metastasis. ***Infection And Inflammation: Impacts on Oncogenesis***, v.13, p.191-199, 2006.