



Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular  
Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular

NÁGILA MONTEIRO DA SILVA

**AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE AMIDAS GRAXAS DERIVADAS DE  
TRIGLICERIDEOS DE OLEO DE ANDIROBA (*Carapa guianensis aublet*) EM  
LINHAGEM CELULAR DE GLIOMA *IN VITRO*.**

Belém-PA, 2022

NÁGILA MONTEIRO DA SILVA

**AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE AMIDAS GRAXAS DERIVADAS DE TRIGLICERIDEOS DE OLEO DE ANDIROBA (*Carapa guianensis aublet*) EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOMA *IN VITRO*.**

– Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará –UFPA, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigues de Oliveira

Belém-PA, 2022



Assinatura Legível

**DEFESA FINAL – CURSO DE MESTRADO - PPGNBC**

**Título:** “AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE AMIDAS GRAXAS DERIVADAS DE TRIGLICERÍDEOS DE ÓLEO DE ANDIROBA (*Carapa guianensis Aublet*) EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOMA *IN VITRO*”

**DISCENTE:** NAGILA MONTEIRO DA SILVA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. JOSÉ LUIZ MARTINS DO NASCIMENTO

**LOCAL:** Sala de Reunião Virtual (Google Meet): <https://meet.google.com/mke-jtzm-bwo>

**DATA:** 28 de junho de 2022

**HORA:** 14:00h

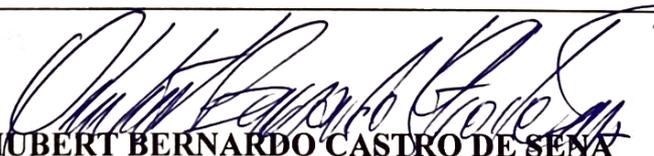
**BANCA EXAMINADORA**

<b>Prof. Dr. JOSÉ LUIZ MARTINS DO NASCIMENTO</b> (Presidente da Banca Examinadora, sem direito a voto)	UFPA
<b>Prof. Dr. FÁBIO RODRIGUES DE OLIVEIRA</b> (Coorientador, sem direito a voto)	UNIFAP
<b>Prof. Dr. CHUBERT BERNARDO CASTRO DE SENA</b> (Membro Titular – Avaliador Interno ao PPGNBC)	UFPA
<b>Prof. Dr. IRLON MACIEL FERREIRA</b> (Membro Titular – Avaliador Externo à Instituição)	UNIFAP
<b>Profa. Dra. EDILENE OLIVEIRA DA SILVA</b> (Membro Suplente)	UFPA

**ITENS EM JULGAMENTO**

	Adequado	Inadequado
01. Apresentação do Trabalho	X	
02. Material e Métodos Utilizados	X	
03. Pesquisa e Organização Bibliográfica	X	
04. Exposição e Defesa do Trabalho	X	

**OBSERVAÇÕES E COMENTÁRIOS** (Obrigatório o preenchimento quando existirem itens julgados como inadequados).

  
**Prof. Dr. CHUBERT BERNARDO CASTRO DE SENA**  
*Membro Titular - Avaliador Interno ao PPGNBC*



Assinatura Legível

**DEFESA FINAL – CURSO DE MESTRADO - PPGNBC**

**Título:** “AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE AMIDAS GRAXAS DERIVADAS DE TRIGLICERÍDEOS DE ÓLEO DE ANDIROBA (*Carapa guianensis Aublet*) EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOMA *IN VITRO*”

**DISCENTE:** NAGILA MONTEIRO DA SILVA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. JOSÉ LUIZ MARTINS DO NASCIMENTO

**LOCAL:** Sala de Reunião Virtual (Google Meet): <https://meet.google.com/mke-jtzm-bwo>

**DATA:** 28 de junho de 2022

**HORA:** 14:00h

**BANCA EXAMINADORA**

<b>Prof. Dr. JOSÉ LUIZ MARTINS DO NASCIMENTO</b> (Presidente da Banca Examinadora, sem direito a voto)	UFPA
<b>Prof. Dr. FÁBIO RODRIGUES DE OLIVEIRA</b> (Coorientador, sem direito a voto)	UNIFAP
<b>Prof. Dr. CHUBERT BERNARDO CASTRO DE SENA</b> (Membro Titular – Avaliador Interno ao PPGNBC)	UFPA
<b>Prof. Dr. IRLON MACIEL FERREIRA</b> (Membro Titular – Avaliador Externo à Instituição)	UNIFAP
<b>Profa. Dra. EDILENE OLIVEIRA DA SILVA</b> (Membro Suplente)	UFPA

**ITENS EM JULGAMENTO**

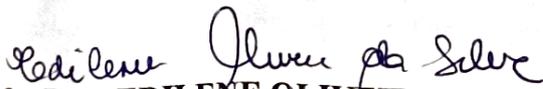
	Adequado	Inadequado
01. Apresentação do Trabalho	X	
02. Material e Métodos Utilizados	X	
03. Pesquisa e Organização Bibliográfica	X	
04. Exposição e Defesa do Trabalho	X	

**OBSERVAÇÕES E COMENTÁRIOS** (Obrigatório o preenchimento quando existirem itens julgados como inadequados).

---

---

---

  
**Profa. Dra. EDILENE OLIVEIRA DA SILVA**  
Membro Suplente



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - CURSO DE MESTRADO - PPGNBC**

**Esta ata não tem equivalência com a finalização do curso**

**Programa:** Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular  
**Área de concentração:** BIOLOGIA CELULAR

**Discente:** NAGILA MONTEIRO DA SILVA

**Título:** “AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DE AMIDAS GRAXAS DERIVADAS DE TRIGLICERÍDEOS DE ÓLEO DE ANDIROBA (*Carapa guianensis Aublet*) EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOMA *IN VITRO*”

**Data:** 28 de junho de 2022, às 14:00 horas.

**Local:** Sala de Reunião Virtual (Google Meet): <https://meet.google.com/mke-jtzm-bwo>

Após a discente apresentar sua dissertação para a obtenção do título de Mestre e responder as perguntas da banca examinadora, a comissão reuniu-se e resolveu pela sua:

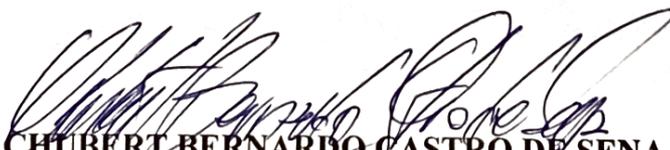
APROVAÇÃO

REPROVAÇÃO

Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrados os trabalhos, esta ata foi lavrada e assinada por todos os membros da comissão examinadora.

  
Prof. Dr. JOSÉ LUIZ MARTINS DO NASCIMENTO (UFPA).  
(Presidente da banca examinadora e Orientador, sem direito a voto)

  
Prof. Dr. FÁBIO RODRIGUES DE OLIVEIRA (UNIFAP).  
(Coorientador, sem direito a voto)

  
Prof. Dr. CHUBERT BERNARDO CASTRO DE SENA (UFPA).  
(Examinador Interno ao PPGNBC).



*Universidade Federal do Pará*  
*Instituto de Ciências Biológicas*  
*Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular*



Prof. Dr. **IRLON MACIEL FERREIRA** (UNIFAP)  
(Examinador Externo à Instituição)

*Edilene Oliveira da Silva*

Profa. Dra. **EDILENE OLIVEIRA DA SILVA** (UFPA).  
(Suplente)

## AGRADECIMENTOS

*A Deus que iluminou meu caminho ao durante toda esta jornada.*

*A minhas duas mães (avó é mãe duas vezes) **Nely Monteiro e Jiselle Diniz** pelo apoio, incentivo, conchinhos e amor incondicional.*

*A toda minha família pelo suporte em especial a **Waléria** pelo carinho.*

*A **Isabella Lopes**, pela amizade de tantos anos, parceria de todos os dias, conversas, choros e risadas. Sua colaboração nesse trabalho foi muito importante do início ao fim.*

*A **Jessica Pinheiro**, pelas conversas e seu incentivo sem ela eu não teria nem iniciado esse mestrado. Sou muito grata pela sua amizade.*

*Ao **Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento**, dedico minha admiração por seu amor a ciência e agradeço pela oportunidade, por abrir as portas do laboratório, orientação e pelos ensinamentos diários que com certeza levarei para a vida toda.*

*Ao **Prof. Dr. Fábio Rodrigues** pela orientação, apoio, ajuda e amizade que tornaram possível a conclusão desta dissertação.*

*A todos os que fazem e fizeram parte do **Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular** em especial a **Prof. Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Barbarela de Matos Macchi** pelos ensinamentos valiosos para minha formação acadêmica. E também aos amigos Neide, Eline, Priscila, Anne e Dayane.*

*A todos os que fazem e fizeram parte do **Laboratório de Biologia Estrutural** em especial a **Prof. Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edilene Oliveira da Silva** pela ajuda e disponibilidade sempre. E também ao doutorando **Adam Gaule** pela ajuda indispensável.*

*Ao **Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira** do Grupo de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada Da UNIFAP pela colaboração e disponibilidade, o meu muito obrigado.*

*A CAPES pela concessão de bolsa de estudo.*

*A Universidade Federal do Pará, a todos os professores e amigos do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular que direta ou indiretamente me ajudaram durante a graduação.*

## RESUMO

Glioma é um tipo de tumor raro, que afeta o sistema nervoso de maneira bastante agressiva, possui difícil diagnóstico, tratamentos com baixa efetividade e sobrevida menor que um ano. Em virtude de fatores como a variabilidade celular intratumoral, a limitação de agentes quimioterápicos existentes, o desenvolvimento de resistência adaptativa do câncer ao tratamento e a reincidência tumoral pós-cirurgia, se faz necessário o desenvolvimento de novos tratamentos. Nesse contexto, moléculas análogas a endocanabinóides como as amidas graxas (AG) se mostram uma boa alternativa, visto que a literatura aponta a existência de ação antitumoral através da interação com este sistema, o qual modula diversas vias metabólicas ligadas ao câncer. Neste trabalho foram sintetizadas dois grupos de amidas graxas (AG1 e AG2) a partir do óleo de andiroba (*Carapa guianensis aublet*) utilizando lipase de *Candida antarctica*-B (CAL-B) avaliado seus potenciais contra células de glioma *in vitro* (C6). As AGs reduziram a viabilidade de células de glioma C6 de maneira dose dependente e não foram citotóxicas em células de glia saudáveis. Ambos grupos causaram morte celular por apoptose além de causar perda de integridade mitocondrial provavelmente inibindo a via PI3k/AKT. Além disso, as AGs foram capazes de reduzir o potencial migratório da linhagem celular C6. Concluindo, as AGs possuem potencial promissor para tratar glioma *in vitro*.

**Palavras-chave:** Amidas Graxas. Andiroba. Endocanabinóides. Glioma.

## ABSTRACT

Glioma is a rare type of tumour, which acts on Nervous System in a very aggressive way, presents problems in its diagnosis, low effective treatments and survival time less than one year after diagnosis. Due to factors such as intratumoral cell variability, inefficient chemotherapy drugs, adaptive resistance development to the drugs and tumour recurrence after resection, the development of new drugs becomes necessary. In this sense, molecules analogues to endocannabinoids such as fatty amides are a good alternative, since scientific literature shows that they can act as antitumor agents through the interaction with the endocannabinoid system, which modulates many metabolic pathways related to cancer. In this work, two fatty amides synthesized from andiroba (*Carapa guianensis aublet*) using lipase from *Candida antarctica*-B (CAL-B) oil were tested aiming to evaluate its potential in the glioma treatment *in vitro* (C6). AGs reduced C6 cell viability in a dose dependent manner while were not toxic to normal glia cells. Both FAA1 and FAA2 caused apoptosis cell death and also loss of mitochondrial integrity probably by inhibiting PI3k/AKT pathway. Furthermore, FAAs were capable of reduce the C6 migratory potential. In conclusion FAAs have a promising potential to treat glioma-type brain cancer.

**Keywords:** Glioma. Andiroba. Fatty amides. Endocannabinoids.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Tipos de canceres de origem glial e suas respectivas células de origem.....	11
<b>Figura 2</b> - Estrutura química de alguns exemplos de fitocanabinóides, endocanabinóides e análogos a endocanabinóides.....	15
<b>Figura 3</b> - Porcentagem de hemólise das amidas graxas 1 e 2 .....	27
<b>Figura 4</b> - Curva temporal de viabilidade da linhagem celular de glioma C6 .....	28
<b>Figura 5</b> - Curva de viabilidade em células de glia mediante ao tratamento com AGs durante 12h. ....	29
<b>Figura 6</b> - Efeito das amidas graxas 1 e 2 na morte celular de gliomas (C6) .....	30
<b>Figura 7</b> - Avaliação da integridade mitocondrial de células C6 .....	31
<b>Figura 8</b> - Efeito das amidas graxas 1 e 2 na migração de células C6 .....	31
<b>Figura 9</b> - Análise morfológica da marcação com as sondas DAPI e Mitotracker e imagens sobrepostas em células C6.....	32
<b>Figura 10</b> - Análise de Western Blotting .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	2-Arachidonoyl glicerol
AEA	Anandamida
AG	Amida Graxa
ATF-4	Fator de transcrição 4
CB1	Receptor Canabinóide 1
CB2	Receptor Canabinóide 2
CBD	Canabidiol
CHOP	Proteína homóloga C/EBP
DAGL	Lipase de Diacilglicerol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAAH	Hidrolase de amida de ácido graxo
FBS	Soro Bovino Fetal
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GMB/GM	Glioblastoma Multiforme
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MAGL	Lipase de Monoacilglicerol
MMP'S	Metaloproteinases
MNU	N-metil-N-nitrosureia
MTT	. -3-(4,5- <i>dimetil</i> -2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NAPE	N-araquidonilfosfatidiletanolamina
NAPE-FLD	N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina-fosfolipase-D
OEA	Oleoiletanolamida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato-salino
PEA	Palmitoiletanolamida
PI	Iodeto de Propídio
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
RAPG	Receptores associados a proteína G

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo 1
$\Delta^9$ -THC	$\Delta^9$ -tetra-hidrocanabinol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b><u>INTRODUÇÃO .....</u></b>	<b><u>8</u></b>
<b>2</b>	<b><u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b>2.1</b>	<b><u>ASPECTOS GERAIS DOS GLIOMAS .....</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b>2.2.1.</b>	<b><u>ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE .....</u></b>	<b><u>14</u></b>
<b>2.2.2.</b>	<b><u>ATIVIDADE ANTITUMORAL DE ENDOCANABINÓIDES E SEUS ANÁLOGOS... ..</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b>3</b>	<b><u>OBJETIVOS .....</u></b>	<b><u>20</u></b>
<b>3.1</b>	<b><u>OBJETIVO GERAL .....</u></b>	<b><u>20</u></b>
<b>3.2</b>	<b><u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</u></b>	<b><u>20</u></b>
<b>4</b>	<b><u>METODOLOGIA.....</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b>5</b>	<b><u>RESULTADOS .....</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b>5.1</b>	<b><u>HEMÓLISE .....</u></b>	<b><u>28</u></b>
<b>5.2</b>	<b><u>VIABILIDADE CELULAR.....</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b>5.3</b>	<b><u>ENSAIO DE APOPTOSE E NECROSE.....</u></b>	<b><u>29</u></b>
<b>5.4</b>	<b><u>ENSAIO DE INTEGRIDADE MITOCONDIAL.....</u></b>	<b><u>30</u></b>
<b>5.6</b>	<b><u>CITOQUÍMICA .....</u></b>	<b><u>31</u></b>
<b>5.7</b>	<b><u>WESTERN BLOTTING .....</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b>5.8.</b>	<b><u>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</u></b>	<b><u>37</u></b>
<b>6</b>	<b><u>DISCUSSÃO .....</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b>7</b>	<b><u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</u></b>	<b><u>36</u></b>

## 1 INTRODUÇÃO

Gliomas são cânceres que atingem o Sistema Nervoso central (SNC), são raros correspondendo a apenas 1,4% dos cânceres no mundo. No entanto, os gliomas de alto grau são agressivos e difíceis de diagnosticar de modo que a sobrevivência dos pacientes é em média, menor que um ano após o diagnóstico (DESOUZA *et al.*, 2016). Os tratamentos disponíveis atualmente incluem a quimioterapia, radioterapia e cirurgia de ressecção, porém não são eficientes e possuem altas taxas de recidiva. Dentre os fatores que dificultam o tratamento podemos citar as dificuldades no diagnóstico, a variabilidade celular intratumoral, a limitação de agentes quimioterápicos existentes, o desenvolvimento de resistência adaptativa do câncer ao tratamento e a reincidência tumoral pós-cirurgia (MIRANDA-FILHO *et al.*, 2017). Além disso, devido a existência da barreira hematoencefálica, os fármacos utilizados para o tratamento de gliomas são apresentados em doses muito altas, causando toxicidade em tecidos periféricos (SHERGALIS *et al.*, 2018).

Em virtude de tais dificuldades, surge a necessidade de tratamentos efetivos contra os gliomas, onde o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais se mostram uma alternativa atrativa. Nesse contexto, a Amazônia apresenta-se como uma fonte rica de espécies nativas com potencial biotecnológico, muitas das quais já são utilizadas na medicina tradicional da região (CHAMBERLIN *et al.*, 2019; PORFÍRIO-DIAS *et al.*, 2020).

A andiroba (*Carapa guianensis aublet*) é uma espécie da qual se utiliza o óleo proveniente de sua semente para produção de medicamentos e cosméticos. O óleo de andiroba é rico em ácidos graxos como os ácidos oleico, palmítico e linoleico (MILHOMEN-PAIXÃO *et al.*, 2016). A partir desses óleos é possível sintetizar amidas graxas (AG), moléculas análogas aos endocanabinóides.

O sistema endocanabinóide modula diversos sistemas do organismo humano incluindo o SNC e por esse motivo, moléculas capazes de interagir com esse sistema vem sendo investigadas para o tratamento de diversas doenças (CHANDA *et al.*, 2019). Tendo em vista que já existem trabalhos na literatura, que mostram a atividade antitumoral dessas moléculas bem como a importância do sistema endocanabinóide no mecanismo de desenvolvimento do câncer (MACCARRONE *et al.*, 2000; BIFULCO *et al.*, 2006; SCHAWARZ *et al.*, 2018), neste trabalho, serão utilizados dois grupos de

AG análogas a endocanabinóides que foram sintetizadas a partir do óleo de andiroba, para avaliar seu potencial no tratamento de células de glioma *in vitro*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos Gerais dos Gliomas

Gliomas são denominados todos os tumores cerebrais originados de células gliais, que são um conjunto de células muito importantes para manutenção do sistema nervoso, desempenhando funções na homeostase, metabolismo, transmissão sináptica e desenvolvimento (BLUTSTEIN *et al.*, 2013). Gliomas são raros, compondo apenas 1,8% dos cânceres, porém são bastante agressivos e letais. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) no ano de 2019 houve mais de 9000 mortes por câncer do SNC no Brasil e estima-se que surjam cerca de 11.090 casos ao ano, sendo 5.870 homens e 5.220 mulheres.

Embora mais prevalente em adultos, ocorrendo mais frequentemente em idosos com idade a partir de 64 anos, crianças também podem desenvolver essa patologia (DAVIS *et al.*, 2016). Entre os sintomas observados estão dor de cabeça, náusea, vômito, falta de equilíbrio, incontinência urinária, deficiência no campo visual, convulsão e coma. Apesar da existência de diagnóstico por imagem, existe certa dificuldade em classificar esses cânceres, muito devido a heterogeneidade na população celular que compõe tais tumores (HANIF *et al.*, 2017).

Segundo a OMS, os gliomas podem ser classificados de acordo com aspectos histológicos relacionados ao tipo celular glial de origem (astrócito, oligodendrocito ou células ependimais) (Figura 01), originando astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas. Os astrocitomas, podem ser divididos ainda, em graus de malignidade sendo eles: grau I (astrocitoma pilocítico), II (astrocitoma de baixo grau), III (astrocitoma anaplasico) e IV (glioblastoma multiforme) (CIAGLIA *et al.*, 2015).

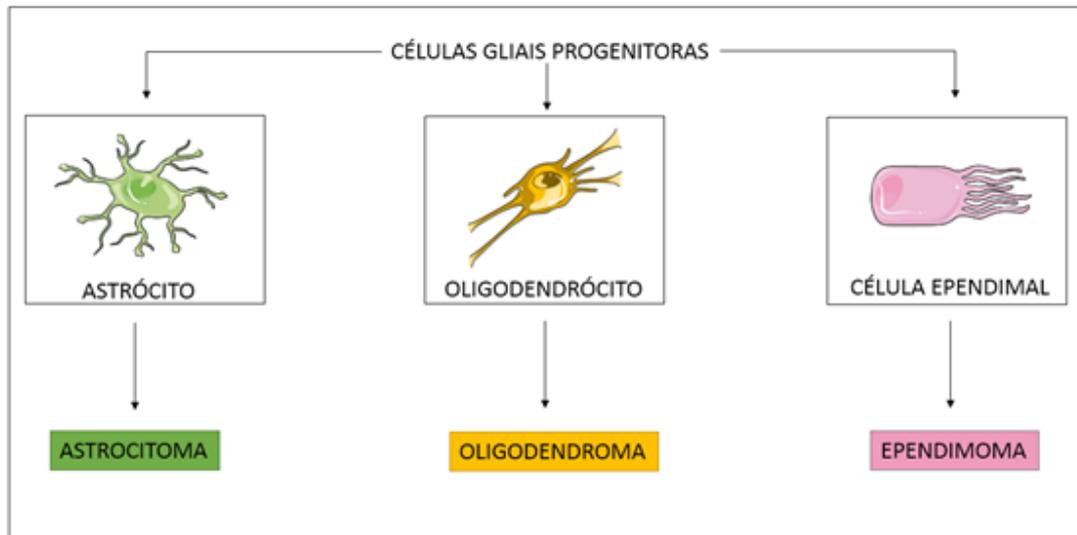


Figura 1 - Tipos de cânceres de origem glial e suas respectivas células de origem. (Fonte: Adaptado de Rao, 2004).

Assim como os astrócitos são as células gliais mais populosas do SNC, os astrocitomas são o tipo de câncer cerebral mais comum e mais maligno, destacando-se o Glioblastoma Multiforme (GM), que corresponde a 46% dos gliomas. São caracterizados pela heterogeneidade de suas populações celulares letais e resistentes às terapias existentes (AJUM *et al.*, 2017; PERSAUD-SHERMAN, 2017), e podem ser divididos em primário, que abrange 90% dos GMs e secundário, que surge a partir de um outro tipo de astrocitoma de menor grau (HW LO *et al.*, 2010).

Assim como outros tipos de câncer, os gliomas surgem em resultado de um acúmulo de mutações em genes denominados supressores de tumor e proto-oncogenes. Tais mutações podem ter relação hereditária e/ou fatores externos como exposição a radiação e substâncias carcinogênicas. Entretanto, ao contrário de alguns tipos de câncer onde um fator específico é determinante, não há evidências de nenhum fator externo diretamente relacionado ao surgimento do câncer cerebral. Algumas doenças de caráter hereditárias podem estar associadas ao surgimento desse tipo de neoplasia, tais quais, doença de Von Hippel-Lindau, neurofibromatose de tipos 1 e 2, esclerose tuberosa, schwannomatose familiar, entre outras (RAO *et al.*, 2004; OMURO & DEANGELIS, 2013)

Além disso, a transformação neoplásica pode atingir células tronco adultas, gerando populações celulares chamadas células tronco tumorais, as quais matem o crescimento tumoral em virtude da capacidade dessas células de se auto renovar (CLARKE & HASS, 2004).

Quadro 1 – Classificação dos astrocitomas.

<b>CLASSIFICAÇÃO DE ASTROCITOMAS</b>		
<b>TUMORES ASTROCÍTICOS DIFUSOS</b>	Astrocitoma difuso (Mutaçao – IDH)	Grau II
	Astrocitoma anaplásico (mutação – IDH)	Grau III
	Glioblastoma (Tipo selvagem)	Grau IV
	Glioblastoma (mutação – IDH)	Grau IV
	Glioma difuso da linha média (mutação – H3 k27M)	Grau IV
<b>OUTROS TUMORES ASTROCÍTICOS</b>	Astrocitoma pilomixóide	incerto
	Xantroastrocitoma pleomórfico	Grau II
	Xantroastrocitoma pleomórfico anaplásico	Grau III
	Astrocitoma Subependimário de Células gigantes	Grau I

Fonte: adaptado de INCA, 2016.

Atualmente os tratamentos disponíveis são, principalmente a cirurgia para remoção do tumor, quimioterapia, sendo os agentes mais comuns a nitrosureia, bevacizumab e tomozolomida (TMZ). Além de radioterapia, terapia antiangiogênica e terapia gênica, bem como a utilização de mais de um desses tratamentos em conjunto. Entretanto, mesmo quando efetuada uma ressecção tumoral, as chances de ressurgimento do tumor é bastante alta, girando em torno de 90% e apresentando um índice de sobrevivência que gira em torno de 3 a 5% em um período de 3 anos. Isso se dá devido a alta probabilidade de células neoplásicas remanescentes se espalhem em regiões vizinhas, promovendo reincidência (PEARSON *et al.*,2017).

Nesse contexto, não há um protocolo de tratamento definitivo para gliomas e busca-se por receptores alvo para desenvolvimento de novos fármacos. Porém a eficiência desses fármacos é comprometida devido a existência da barreira

hematoencefálica, que dificulta a entrada de certas moléculas no SNC, de modo que muitos fármacos não chegam ao local ou chegam em menor concentração e ainda causam toxicidade em tecidos vizinhos (GANIPINENI *et al.*, 2018; SHERGALIS *et al.*, 2018).

Existem ainda outras dificuldades no tratamento de gliomas como a existência de células tronco tumorais que são resistentes aos tratamentos de radioterapia e quimioterapia, a administração de fármacos em tecidos tumorais heterogêneos culmina na resistência de certas populações celulares através de pressão seletiva, problemas no diagnóstico e falta de biomarcadores para atingir células específicas (CHAKRABORTY & RAHMAN, 2012; BATLLE & CLEAVERS, 2017; PUCCI *et al.*, 2019). Desta forma, é necessário o desenvolvimento de novas pesquisas para aumentar o arsenal terapêutico de fármacos afim de encontrar novas terapias contra os gliomas.

Um dos modelos mais utilizados para estudos de novas drogas contra gliomas é a linhagem celular de glioma C6, a qual é oriunda de ratos Wistar, obtida com a utilização do carcinógeno N-metil-N-nitrosureia (MNU) na década de 1960. É um modelo seguro utilizado para estudos farmacológicos em geral e mais especificamente de câncer cerebral, isso se dá devido sua similaridade com glioblastoma multiforme humano caracterizado por expressar marcadores que facilitam investigações histoquímicas produzindo um modelo altamente angiogênico que pode substituir a utilização de roedores imunodeprimidos. Este modelo tem sido utilizado pra investigar invasão, migração, angiogênese e desenvolvimentos de gliomas. (GYERING *et al.*, 2017; GIAKOUMETTIS, KRITIS, *et al.*, 2018).

Possuem os genes PDGFb, IGF-1, EGFR e Erb3/Her3 superexpressos, os quais também se encontram desse modo em glioblastomas humanos (BARTH & KAUR, 2009). Quando injetadas em ratos são capazes de originar tumores com morfologias celulares indefinidas, não expressando a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) comumente expressa em astrócitos normais (não neoplásicos), além de apresentar regiões de necrose mimetizando tumores GBM (GROBBEN *et al.*, 2002).

Ademais, a linhagem celular C6 vem sendo utilizada para testes com produtos naturais com potencial citotóxico para células cancerígenas, destacando-se por exemplo, o extrato etanólico de *Tinospora cordifolia*, que foi testado nessa linhagem, demonstrando-se a atividade inibitória do ciclo celular do referido composto (MISHRA *et al.*, 2013). Assim como o a curcumina, um componente ativo do açafrão, que segundo

Fong *et al* (2010), leva à diminuição da proliferação de glioblastoma *in vitro*. Nesse contexto, a linhagem celular C6 é apropriada para os experimentos que serão realizados neste trabalho, bem como para futuras comparações com demais produções presentes na literatura.

## 2.2 Sistema Endocanabinóide e o Tratamento do Câncer

### 2.2.1. Aspectos Gerais do Sistema Endocanabinóide

O sistema endocanabinóide recebe esse nome em virtude da descoberta deste estar associada à espécie *Cannabis sativa*, a qual vem sendo utilizada de maneira recreativa e medicinal há milênios, com registros que datam cerca de 2000 a.C. Desde o século XIX as moléculas neuroativas provenientes desta planta passaram a ser investigadas, e somente na década de 1930 o primeiro ativo foi identificado, o canabinol, seguido pela identificação das estruturas do canabidiol (CBD) e do  $\Delta^9$ -tetrahydrocanabinol (THC), que foram elucidadas na década de 60 por Gaoni e Mechoulam (ZUARDI & WALDO, 2006).

A partir da caracterização do THC, veio a investigação de receptores alvo destas substâncias, os quais foram denominados receptor canabinóide 1 (CB1) e receptor canabinoide 2 (CB2,) moléculas endógenas capazes de se ligar a estes foram identificadas as quais foram denominadas endocanabinóides (SOLYMOSSI *et al.*, 2016).

Atualmente sabe-se que a *C. Sativa* possui mais de 100 canabinóides também chamados de fitocanabinóides, sendo THC seu psicoativo mais proeminente, bem como tantas outras moléculas de interesse como os terpenóides. Esses estudos favoreceram a descoberta do sistema endocanabinóide, e outras moléculas como canabinóides sintéticos e substâncias análogas aos endocanabinóides, tais quais Palmitoiletanolamida (PEA) e oleoiletanolamida (OEA), bem como suas funções no organismo (SAGAR *et al.*, 2009).

Os endocanabinóides são moléculas derivadas do ácido araquidônico e ligantes endógenos dos receptores do sistema endocanabinóide (ARTMAN *et al.*, 2008), sendo primeiramente identificado, a *arachidonoyl ethanolamide*, também conhecida como anandamida (AEA) e o 2-Arachidonoyl glicerol (2-AG) (EZZILI *et al*, 2010).

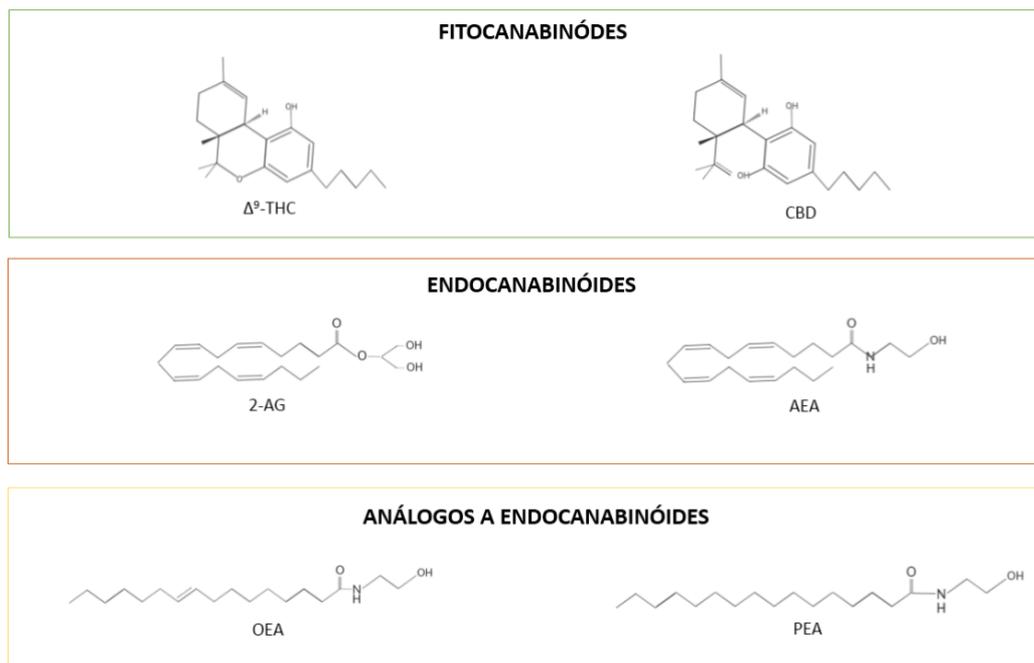


Figura 2 - Estrutura química de alguns exemplos de fitocanabinóides, endocanabinóides e análogos a endocanabinóides.  $\Delta^9$ -THC: tetra-hidrocanabinol; CBD: canabidiol; 2-AG: 2-araquidonoilglicerol; AEA: anandamida; OEA: oleoiletanolamida; PEA: Palmitoiletanolamida (Fonte: Adaptado de Tsuboy *et al.*, 2018)

O sistema endocanabinoide, é conhecido como sistema diversificado, pois pode ser encontrado em todas as células e é capaz de interagir com qualquer sistema fisiológico, podendo agir na modulação de diversos processos metabólicos. Das muitas funções e atuações que o sistema endocanabinoide desempenha, destaca-se a neuromodulação, seja ela parácrina ou endócrina, envolvimento na sinalização celular em processos de diferenciação, proliferação e morte celular (DI MARZO *et al.*, 2004).

Devido sua grande diversidade de atuação, não se pode afirmar total conhecimento a respeito deste sistema. Entretanto, sabe-se que além dos endocanabinóides em si, este sistema é composto por receptores, enzimas de degradação e de síntese (LIGRESTI *et al.*, 2016).

Os receptores endocanabinóides CB1 e CB2 são pertencentes a classe de receptores associados a proteína G (RAPG). CB1 é um receptor mais frequentemente encontrado em células do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo mais densamente encontrados no córtex, hipocampo, gânglios basais e cerebelo. Também são encontrados, em menor frequência, em outros sistemas como o cardiovascular e

reprodutor, já o receptor CB2, foi primeiramente identificado no sistema imune. Pode ser também encontrado em tecidos vasculares e respiratórios, trato gastrointestinal além de fígado e sistema reprodutor e em menor quantidade no SNC mais especificamente em neurônios e micróglias (SVÍŽENSKÁ *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2019). Além destes, receptores associados a proteína G, GPR55 e GPR119 também estão envolvidos com o efeito dos canabinóides no metabolismo. GPR55 por exemplo, está associado a progressão tumoral e a inibição desse receptor reduz tumores glioblastoma (TOMKO, 2019). Ainda, KHOO (2013), demonstra que agonistas do receptor PPAR $\gamma$  possuem efeitos antineoplásicos reduzindo a viabilidade de células de glioma C6.

Já o receptor transitório valinóide do tipo 1 (TRPV1), mais recentemente, foi considerado um “receptor canabinóide inotrópico adicional”. Expresso em neurônios, predominantemente naqueles relacionados a nocicepção, podendo estar relacionado a dor, sensação térmica, homeostase, inflamação e outros (HAMTIAUX *et al.*, 2011; STOROZHUK *et al.*, 2019). O TRPV1 é um canal catiônico majoritariamente de íons de cálcio. É mais expresso no hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatório e medula espinhal. Além disso, esses receptores são expressos não somente em neurônios mais também em mastócitos e micróglias. Possui uma vasta lista de ligantes, incluindo o endocanabinóide AEA (SZALLASI *et al.*, 2007; K.Ho *et al.*, 2012).

A ligação entre receptor e ligante endocanabinóide é bastante variada. Um mesmo ligante é capaz de se ligar tanto a CB1 quanto em CB2 resultando, porém, em respostas fisiológicas distintas (SHAHBAZI *et al.*, 2020). Além disso, os endocanabinóides não se encontram disponíveis constantemente no organismo, mas sim, produzidos quando necessário. No sistema nervoso central, a disponibilidade de endocanabinóides pode aumentar em resposta a um aumento da concentração de cálcio (MECHOULAM *et al.*, 2014).

Existem também enzimas responsáveis pela regulação do sistema endocanabinóide, atuando na síntese ou degradação dessas moléculas. Dentre as enzimas envolvidas na síntese, podemos citar a N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina-fosfolipase-D (NAPE-FLD), responsável pela produção da AEA, tendo como principal precursor a N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NAPE). Já 2-AG tem como precursores os diacilgliceróis (DAGs), que são produzidos a partir da hidrólise de lipídios de membrana como fosfatidil inositol o qual é posteriormente hidrolisado pela diacilglicerol lipase (DAGL) (SAILLER *et al.*, 2014).

No contexto da degradação dos endocanabinóides, destaca-se a hidrolase de amida graxa (FAAH) e a lipase monoacilglicerol (MAGL), que são responsáveis pela hidrólise dos endocanabinóides, sendo que a primeira hidrolisa AEA a ácido araquidônico e etanolamida e a segunda hidrolisa 2-AG em glicerol e ácido Araquidônico. Ambas estão, desse modo, intimamente relacionadas ao termino da ação de endocanabinóides, além de atuarem como alvo de outras moléculas análogas a endocanabinóides como PEA e OEA (BATTISTA *et al.*, 2017).

### 2.2.2. Atividade antitumoral de endocanabinóides e seus análogos

Atualmente, os canabinóides são utilizados como adjuvantes na terapia cancerígena, atuando como preventivos para náusea, vomito e dor agindo de maneira complementar aos tratamentos convencionais. Entretanto, evidências encontradas na literatura, tanto em trabalhos com modelos *in vivo* quanto *in vitro* mostram que os canabinóides, assim como endocanabinóides e seus análogos, apresentam atividade antitumoral, promovendo apoptose das células neoplásicas e a diminuição de migração e da angiogênese em tumores (MACCARRONE *et al.*, 2000; BIFULCO *et al.*, 2006; SCHAWARZ *et al.*, 2018).

Em 1975, Munson e colaboradores mostraram em sua pesquisa com células neoplásicas provenientes de adenocarcinoma do pulmão, que o tetrahydrocannabinol (TCH) inibe o crescimento destas células. A partir deste primeiro registro, os mecanismos que levam a essa atividade antitumoral vem sendo estudados em diversos tipos de câncer como câncer de mama, pulmão, próstata, linfomas e gliomas, percebendo-se que a inibição da atividade neoplásica, está envolvida com a ativação dos receptores CB1 e CB2 (mas não se limitam a ele). Demonstrando assim, o envolvimento do sistema endocanabinóide, responsável pela modulação de diversos sistemas (GUZMAN, 2003).

Em virtude da ubiquidade dos receptores endocanabinóides e dos outros agentes desse sistema, esses receptores modulam, dependendo do tipo de câncer e do tipo de celular afetado, vias pró-apoptóticas e também aquelas ligadas a sobrevivência celular, tais quais PI3/Akt e Raf1/Mek/Erk (DIMITRU *et al.*, 2018).

O equilíbrio e bom funcionamento das vias citadas anteriormente, são de extrema importância para a manutenção do ciclo celular, visto que o desequilíbrio delas

estão muitas vezes, ligadas ao surgimento de câncer (FOSTER, 2008). A AEA, apresenta atividade contra células de câncer devido influência no ciclo celular, aumentando a quantidade de células em fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e reduzir a quantidade de células em G<sub>2</sub>/M, reduzindo a proliferação (LAEZZA *et al.*, 2020; MA *et al.*, 2016).

Dentre os cânceres cerebrais, o glioblastoma multiforme é um dos canceres mais letais, resistentes e não responsivos as terapias existentes. Nesse contexto, células provenientes de glioblastoma vem sendo bastante utilizadas para estudos com diversos tratamentos em potencial, inclusive tratamento com canabinóides e seus análogos (MORENO *et al.*, 2018).

Em glioblastoma, a ativação de vias pró-apoptóticas, desencadeada pela ativação dos receptores CB1 e CB2, está ligada ao aumento da síntese de esfingolípídios, em especial a ceramida que é um esfingolípídio ubíquo que atua como mensageiro secundário, derivado da hidrólise da esfingomielina (VELASCO *et al.*, 2005; AJUM *et al.*, 2017).

A ceramida age principalmente na diferenciação celular, atuando em vários locais, incluindo o SNC e é, também um esfingolípídio pró-apoptotico. Quando a quantidade de ceramidas se encontra elevada, aumenta os níveis da proteína p38 que recruta caspases levando a apoptose, além de induzir a expressão de genes relacionados a estresse e ao reticulo endoplasmático ativando fatores de transcrição como fator 4(ATF-4) e proteína homologa C/EBP (CHOP) e pseudoquinase. Ademais, o aumento das ceramidas também provoca a inibição de vias ligadas a sobrevivência celular tais quais PI3k/akt e Raf1/MEK/ERK (LAEZZA *et al.*, 2020).

De maneira indireta, há registros da atividade de OEA e PEA, que são análogos de endocanabinóides, aumentando o efeito da anandamida, atuando através do receptor TRPV1, inibindo de FAAH. Similarmente, a AEA é capaz de se ligar ao receptor valinóide diminuindo a viabilidade de células C6 (ELLERT-MIKLASZEWSKA *et al.*, 2017).

Outra via que culmina em apoptose da célula neoplásica, se trata da fosforilação da proteína pro-apoptotica BAD causando como consequência a desintegração da membrana mitocondrial (FOWLER *et al.*, 2010; RAMER *et al.*, 2019).

Além de ativar vias pro-apoptoticas, a ativação de receptores endocanabinóides também pode culminar na inativação de vias pró sobrevivência, a exemplos de estudos com células de glioma que reportam a inibição das proteínas fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase B, também chamada de AKT. A inativação dessas

vias a progressão do ciclo celular de forma a diminuir a proliferação (MACCARRONE *et al.*, 2002).

Além da influência direta na apoptose e ciclo celular, há evidências de que o CBD provoca o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e em consequência, ativação da via intrínseca da apoptose (ZHOU *et al.*, 2019). Paloczi (2018), por exemplo, descreve em sua revisão o aumento da produção de ROS em células do endotélio e músculo liso através da ativação de o que por sua vez leva a ativação de vias de apoptose. Em contraste, a mesma revisão mostra que o endocanabinoide AEA protege neurônios do hipocampo reduzindo ROS. Outros trabalhos demonstram que a ativação de CBs causam, através do aumento na produção de ROs, inibição do metabolismo mitocondrial e atuam na inibição de tumores oriundos de células tronco tumorais de glioma (SINGER *et al.*, 2015; BRAILE *et al.*, 2021).

Ademais, outros autores demonstram que o tratamento de células com CBD inibe proteínas da família das metaloproteinases de matriz (MMP's), as quais são fundamentais para o remodelamento e formação de vasos sanguíneos e consequentemente, inibição da invasão tumoral. (BLÁSQUEZ *et al.*, 2008; KYRIAKOU *et al.*, 2021).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antitumoral de amidas graxas sintetizadas a partir do óleo de andiroba (*Carapa Guianensis* Aublet) contra linhagem de glioblastoma *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Medir a capacidade de gerar danos às membranas biológicas através do teste de hemólise
  
- Avaliar o efeito citotóxico de diferentes grupos de amidas graxas em células de C6 e em cultura primária de glia.
  
- Avaliar padrão de morte celular, caracterizando como apoptótico ou necrótico por citometria de fluxo
  
- Investigar a alteração ou não da integridade mitocondrial gerada pelo tratamento com as Amidas graxas em células C6;
  
- Avaliar possível interação em das AGs com vias apoptóticas.

## 4 METODOLOGIA

### 5.1 Cultura celular de Glioblastoma C6

As células foram cultivadas com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF), 10 U/ml de penicilina e 10µg /mL de gentamicina. As culturas foram mantidas em garrafas de cultivo, a uma temperatura de 37 °C a uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> com troca de meio de cultura a cada 2 dias, com repiques quando necessário.

Para a realização dos experimentos, as células foram lavadas com PBS, posteriormente dissociadas enzimaticamente com tripsina a 0,05%, a qual foi inativada pela adição de 4 mL de meio DMEM e centrifugadas por 3 minutos a 1500 rpm. Posteriormente as células obtidas foram ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer com corante Azul de Trypan e por fim plaqueadas em placas de 96 poços a uma concentração celular de  $2 \times 10^4$  células.

### 5.2 Cultura de células gliais da retina de embrião de galinhas

Para realização das culturas de células de Muller (glias) foram utilizados ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus*, fornecidos pela empresa MAKARÚ LTDA, localizada na cidade de Ananindeua-PA. Os globos oculares foram retirados dos embriões com oito dias após a fecundação (E8) e depositados em placas de Petri contendo meio livre de cálcio e Magnésio (CMF do inglês *calcium free medium*), onde houve a dissecação para obtenção do tecido retiniano livre de outros tecidos. Uma vez obtidas, as retinas foram dissociadas quimicamente com tripsina (0,05%), seguida de dissociação mecânica realizadas com o auxílio de pipetador, sendo as células, em seguida, distribuídas em placas de 24 poços. As culturas foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, e mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi então trocado uma vez por semana, até que foi possível obter uma população majoritária de células gliais após aproximadamente 10 dias.

### 5.3 Obtenção das amidas graxas

Foram utilizadas amidas graxas produzidas e cedidas pelo Laboratório de biocatálise e síntese orgânica aplicada da Universidade Federal do Amapá. A partir do óleo de andiroba (*Carapa guianensis aublet*) coletado em diferentes períodos (Março e Junho de 2020), foram sintetizadas amidas graxas (AG1 e AG2), através de método enzimático utilizando lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B). AG1 e AG2 já foram caracterizadas em estudo prévio e são compostas majoritariamente, em diferentes proporções. AG1 é composta de 26.5% Palmitoiletalonamida (PEA) 4.2% Linoleoiletanolamida (LEA); 52.6% Oleiletalonamida (OEA); estearoiletanolamina 11.1% (SEA). AG2 é composta de 8.5% Palmitoiletalonamida (PEA) 30.2% Linoleoiletanolamida (LEA); 50.1% Oleiletalonamida (OEA); 5.5% Estearoiletanolamina (SEA) (RODRIGUES DE OLIVEIRA et al., 2020).

Para os experimentos, foram preparadas soluções na concentração de 1 mg/mL, utilizando DMEM e DMSO 0.3%, e posteriormente diluídas em DMEM nas concentrações necessárias.

### 5.4 Ensaio de Hemólise

A fim de avaliar a ocorrência de possíveis danos na membrana plasmática, foi realizado o ensaio de hemólise. Para tal, foi coletado sangue de camundongo com heparina a 3%, centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e adicionado uma solução salina 0,9% recentrifugados e ressuspendidos em solução salina a 0,9%, formando uma solução de eritrócitos a 2%. Para o ensaio, foram utilizados as concentrações 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 e 300µg/mL para amidas 1 e 2, como controle negativo foi utilizado DMSO a 0,0005% e como controle positivo foi utilizado solução salina 0,9% e triton X100 a 0,1%. As amostras foram incubadas pelo período de 1 hora, e lidas em espectrofotômetro a 450nm.

### 5.5 Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade celular nas culturas de células C6, após tratamento com as amidas graxas, foi utilizada a análise colorimétrica com *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid* (MTT) . O princípio da técnica baseia-se na capacidade que células viáveis apresentam, de reduzir a forma oxidada do MTT (amarela) a um composto chamado formazan (de cor azulada), sendo o monitoramento desta redução feito por espectrofotometria como descrito por Mosmam em 1983.

Para realização dos testes, células C6 foram plaqueadas e tratadas com AG1 e AG2, nas concentrações 30, 60, 90 e 120 µg/mL pelos intervalos de 6h , 12h, 24h e 48h. O controle negativo consistiu em DMEM adicionado de 0,003% de DMSO. Após os tempos de tratamento, os grupos foram lavados com PBS. Posteriormente, foi adicionado MTT na concentração de 0,5mg/mL e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. A leitura das absorvâncias foi efetuada a 570nm (MAUÉS, 2019) A partir dos resultados obtidos, o valor de IC<sub>50</sub> foi calculado afim de nortear os demais ensaios.

## 5.6 Ensaio de Morte Celular

Para investigar o tipo de morte celular o ensaio de apoptose e necrose foi realizado , como a utilização do “kit Annexin V-FITC” (SALAZAR, 2009). Este ensaio é capaz de identificar a perda de consistência da membrana plasmática, característica da célula em processo de apoptose, baseada na afinidade que a anexina V possui com os fosfolipídios. Foi utilizado Iodeto de Propídio (PI), uma molécula capaz de se intercalar no DNA e incapaz de passar através da membrana plasmática, permitindo a identificação de células em necrose. Além do controle negativo (CTL) foram utilizados controles positivos para apoptose (camptotecina 2µM por 24h) e controle positivo para necrose (Triton X100 0,8% por 15 minutos). As concentrações de amidas graxas utilizadas neste e nos demais testes foram determinadas com base nos resultados dos testes de viabilidade e cálculo de IC<sub>50</sub>, sendo que consistiu em 50 e 70µg/mL para AG1 e 10 e 50µg/mL para AG2. Após 12h de tratamento, as células foram recuperadas,

lavadas com PBS, centrifugadas e ressuspensas em 100µL de tampão de ligação. Posteriormente as células foram marcadas com 10µL de anexina e/ou 1µL de PI, incubadas por 15 minutos e lidas em aparelho de citometria.

### **5.7 Potencial de Membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

Um dos processos indicadores de apoptose celular é a liberação do citocromo C, devido a formação de poros na membrana mitocondrial. A integridade mitocondrial pode ser avaliada através do uso da citometria de fluxo e a utilização dos marcador Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1).

Inicialmente, as células C6 serão plaqueadas e tratadas com as AG1 e AG2 nas concentrações necessárias. Como controle será utilizado meio de cultivo com adição de DMSO (0,3%). Após o período de incubação, as células serão lavadas com PBS e dissociadas quimicamente com solução de tripsina a 0,05%, centrifugadas e suspensas com 250 µl de uma solução de JC-1 a 20 µM em PBS e incubadas por 15 minutos no escuro até a realização da leitura em citômetro de fluxo a 590nm e 530nm. Além do composto J-C1, o controle CCCP (2-[2-(3-Chlorophenyl)hydrazinylydene]propanedinitrile) 50µM foi utilizado, uma molécula capaz de promover o desequilíbrio do potencial de membrana da mitocôndria, um dos sinais envolvidos com apoptose.

### **5.8 Microscopia de Fluorescência**

Afim de observar a mudanças morfológicas, células C6 foram plaqueadas em placa de 24 poços a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço. Tais células foram tratadas pelo período de 12h com AG1 nas concentrações 50 µg/mL e 70 µg/mL; AG2 nas concentrações 10 µg/mL e 30µg/mL. O grupo controle foi tratado com DMEM suplementado com 10% de SBF. Para a realização das marcações, as células foram fixadas em lamínulas com paraformaldeído (PFA) a 3%. Em seguida, como preparo prévio à marcação, as células foram submetidas ao processo de permeabilização com Triton-x 1% e ao bloqueio com Cloreto de Amônio (NH<sub>4</sub>Cl) 50mM.

Para a marcação nuclear com DAPI foi utilizado uma solução ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (TermoFisher) e para marcar as mitocôndrias celulares ativas, utilizou-se a sonda Mitotracker Green FM (invitrogen) 200nM. Células com

mitocôndrias viáveis são capazes de metabolizar a sonda mitotracker apresentando maior intensidade de fluorescência.

### **5.9 Western Blotting**

Para esta análise foram plaqueadas a  $3 \times 10^5$  células por poço, tratadas com as AG1 nas concentrações 50  $\mu\text{g/mL}$  e 70  $\mu\text{g/mL}$ ; AG2 nas concentrações 10  $\mu\text{g/mL}$  e 30  $\mu\text{g/mL}$  por um intervalo de 12h. Após o período de incubação as células foram lavadas com PBS e lisadas em um sonificador com tampão de lise contendo tampão Tris (pH 7,4). Posteriormente, o lisado celular foi centrifugado e o sobrenadante foi recuperado.

As proteínas celulares totais foram dosadas utilizando o reagente de Bradford (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*). Para a leitura foi utilizado 5  $\mu\text{L}$  de amostra e 250  $\mu\text{L}$  de solução de Bradford, e para curva de calibração foi utilizada albumina bovina sérica (BSA) de 0,125mg/ml a 1,4mg/ml (SŁAWIŃSKA-BRYCH, ZDZISIŃSKA, *et al.*, 2014).

50mg de cada amostra foi solubilizada em tampão não redutor com adição de 2% de beta-mercaptoetanol e fervidas por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em sistema de corrida. A corrida foi efetuada a 60 mA e 80 V com tampão de corrida. Posteriormente, as bandas foram transferidas do gel para uma membrana PVDF a 10v X, bloqueadas com leite desnatado a 0,05g/ml. Para a detecção foi utilizado anticorpo primário AKT e P-AKT diluídos a 1:1000 (Cell Signaling Technology).

### **5.10 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Para as análises foi utilizada ANOVA de uma ou duas vias. O nível mínimo de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$  ou  $p < 0,0001$  dependendo do caso. O software GraphPad® Prism 6 foi utilizado para todas as análises.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade Hemolítica das Amidas Graxas

Os resultados mostram que as amidas graxas apresentaram hemólise apenas na concentração mais alta (200  $\mu\text{g/mL}$ ), com 47,45% para AG1 e 59,49% para AG2, respectivamente (Figura 3). Entretanto, nas concentrações inferiores não apresentaram dano significativo às membranas dos eritrócitos, sendo consideradas seguras para utilização em ensaios.

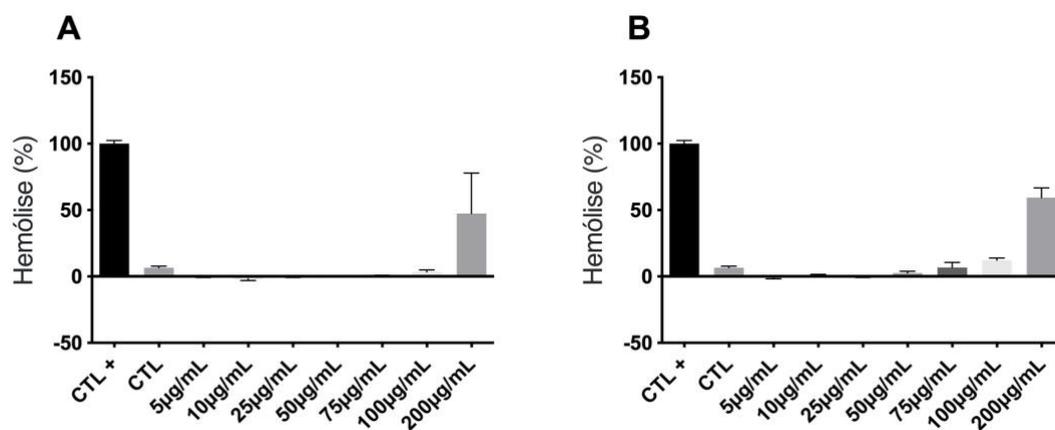


Figura 3 - Porcentagem de hemólise das amidas graxas 1 (A) e 2 (B). Os tratamentos com AG1 e AG2 não causam um percentual significativo de hemólise nas concentrações 5  $\mu\text{g/mL}$  a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os dados foram apresentados como média  $\pm$  DV, considerando-se diferença significativa entre as médias ( $P < 0.05$ ) comparando com o grupo Triton X-100, usando one way ANOVA.

### 5.2 Viabilidade celular

AG1, na maior concentração utilizada (120  $\mu\text{g/mL}$ ), reduziu a viabilidade celular em  $82,05 \pm 0,5\%$  no intervalo de 12h (Figura 4). Já nos intervalos de 6h, 24h e 48h a redução foi de  $70,6 \pm 6$ ,  $81,885 \pm 0,8$  e  $81,9 \pm 1,2\%$ , respectivamente. Para a mesma concentração de 120  $\mu\text{g/mL}$ , AG2 foi capaz de causar a redução de  $83,4 \pm 0,1\%$  com 12h de tratamento e  $83,4 \pm 0,6$ ,  $81,7\% \pm 0,9$  e  $81,4 \pm 1,5\%$  nos intervalos de 6h, 24h e 48h, respectivamente. Ademais, não houve diferença significativa na porcentagem de células do grupo tratado com DMSO 0,003% (Veículo) quando comparada com o grupo controle (DMEM).

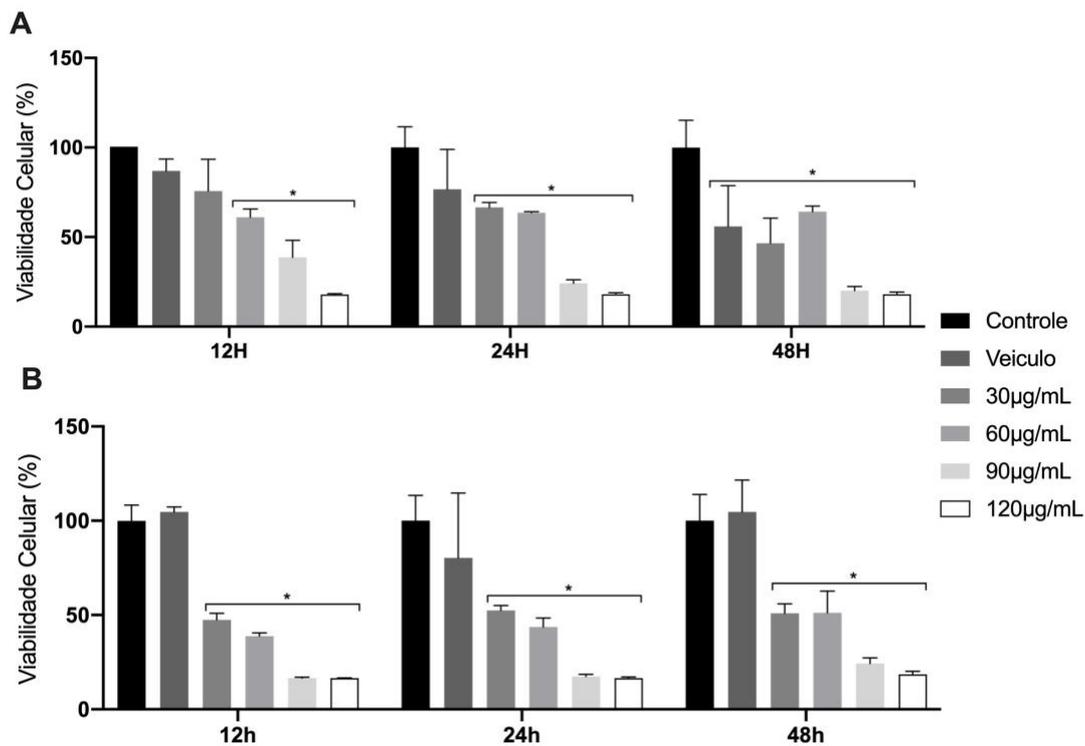


Figura 4 - Curva temporal de viabilidade da linhagem celular de glioma C6 tratadas com as amidas graxas 1 e 2 entre 6h e 48h. As células foram tratadas com as amidas graxas nas concentrações 30, 60, 90 e 120µg/mL e com controle (CTL) constituído de DEMEM e veículo (V) de DEMEM com 0,003% DMSO). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  DV, considerando-se diferença significativa entre as médias. \* $P < 0,05$  (ANOVA, teste de Tukey).

A partir dos resultados de viabilidade foi definido o intervalo de 12h (Figura 4) como tempo de tratamento para os demais experimentos, além de realizado o cálculo para obtenção dos valores de  $IC_{50}$  (concentração inibitória capaz de reduzir a quantidade de células vivas em 50%) para a AG1 (70 µg/mL) e AG2 (30 µg/mL). O tratamento com ambas as amidas graxas gerou uma redução significativa na viabilidade celular das células C6, entretanto a AG2 foi capaz de inibir quase que totalmente a viabilidade das células (16,6%) com a concentração de 90 µg/mL, enquanto que o tratamento com a AG1 atingiu o mesmo resultado a 120 µg/mL ( $P < 0,05$ ).

A fim de comparar a ação das amidas graxas em células normais e neoplásicas, realizou-se o ensaio de MTT com cultura primária de glia (Figura 5). A partir dos cálculos de  $IC_{50}$ , as concentrações estipuladas foram de 70µg/mL para AG1 e 30µg/mL para AG2 pelo período de 12h. observa-se que as AGs nas concentrações testadas, não foram capazes de causar diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) na viabilidade das células não cancerígenas.

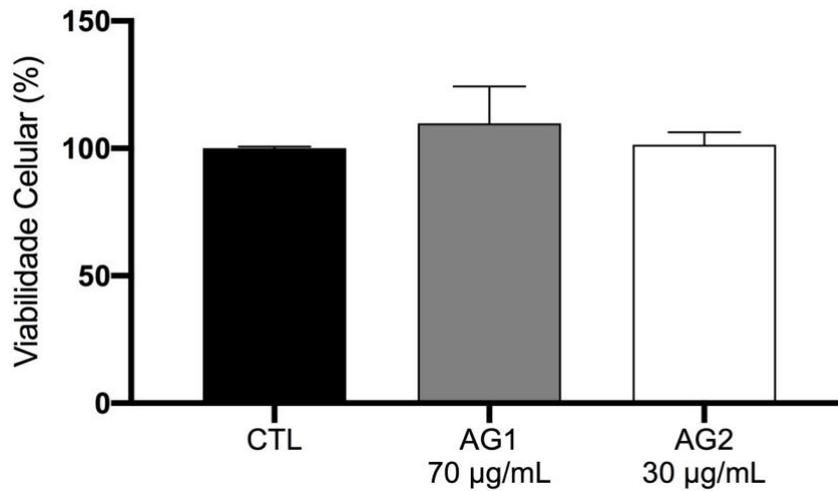


Figura 5 - Curva de viabilidade em células de glia mediante ao tratamento com AGs durante 12h. Nenhuma concentração testada (AG1 70 µg/mL AG2 30 µg/mL) apresentou diferença significativa em relação ao CTL \* $p < 0.05$ , usando one way ANOVA.

### 5.3 Detecção de Apoptose e Necrose

A dupla marcação com *annexin V-FTIC/PI* foi utilizada para determinar que tipo de morte celular as células C6 sofreram pós tratamento com as AGs, apoptose ou necrose. O grupo controle não tratado com AGs apresentou 71.2% de viabilidade celular (calculada como porcentagem do total da população celular), enquanto que a maior parte da população exposta a AG1 (70µg/mL) foi classificada como apoptose (8.37%), apoptose tardia (15.33%) ou necrose (8%). O grupo tratado com AG2 na concentração de 30µg/mL apresentou padrão de morte celular por apoptose de 60.76%, 19.12% apoptose tardia e apenas 0.07% estão em processo de necrose (Figura 6). Nessa concentração (AG2 30µg/mL), houve um melhor resultado em diminuir a população neoplásica entre as duas AGs utilizadas. Mesmo mediante ao tratamento com menor concentração. O controle positivo (camptotensina) induziu 62.4% de morte celular tardia.

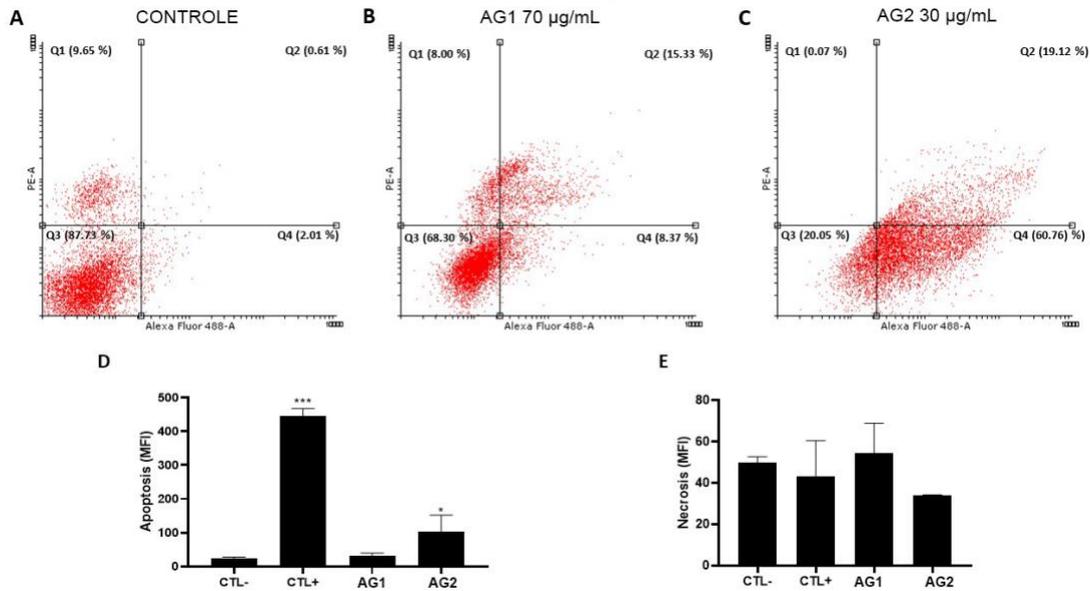


Figura 6 - Efeito das amidas graxas I e II na morte celular de gliomas (C6) marcadas por V-FITC/PI em citometria de fluxo. Gráfico de pontos mostram PE(y) versus Alexa Fuor (x). Células no quadrante 4 (Q4) são consideradas apoptóticas; células marcadas com PI (Q1) são necróticas; a população de células duplamente marcadas (Q2) são classificadas como células em apoptose tardia e em Q3 observam-se as células viáveis. (A) Células não tratadas (Controle). (B e C) Células tratadas com AGs. AG2 aumentou significativamente o nível de morte por apoptose nas células C6. (D) Intensidade de fluorescência de células marcadas com Annexin V. (E) Intensidade de fluorescência de células marcadas com PI. CTL+: Camptotencina (2 µM). Dados representados em media ± SD de três experimentos independentes.

#### 5.4 Detecção do potencial da Integridade Mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

A partir da determinação da morte celular, induzida pelas AGs, como programada (apoptose), buscou-se ratificar o dado obtido avaliando o efeito das AGs na integridade da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). O tratamento efetuado nas células C6 foram nas concentrações 70µg/mL para AG1 e 30µg/mL para AG2. Como resultado da marcação, lida em citometria de fluxo, observa-se maior fluorescência da razão vermelho (PE-A)/verde (Alexa fluor 488-A) no grupo controle em relação aos demais, mostrando a formação de agregados de J-C1, indicando mitocôndrias íntegras. Em contrapartida, observa-se um menor valor da razão vermelho (PE-A)/verde (Alexa fluor 488-A) nos grupos correspondentes aos tratamentos com AG1 e AG2 (Figura 7). Os

tratamentos com AGs foram similares ao tratamento com ontrole positivo CCCP (Carbonilcianeto m-clorofenilhidra-zona).

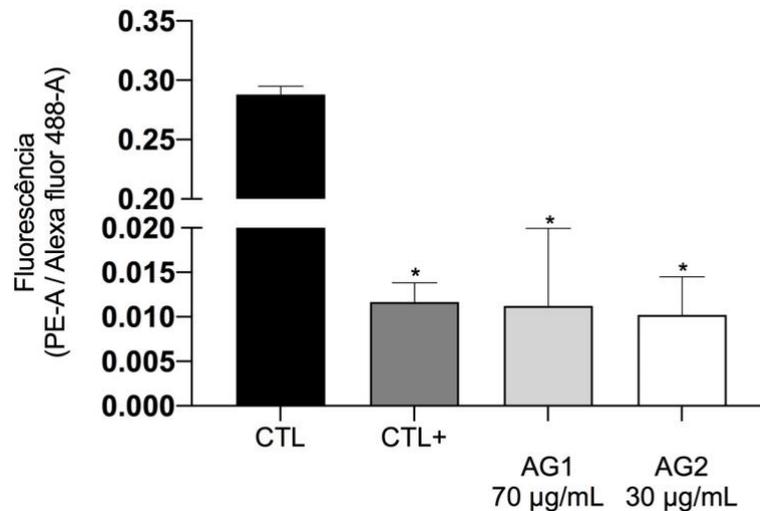


Figura 7 - Avaliação da perda de integridade mitocondrial de células C6 por meio tratamento com ou AG1 (70µg/mL) e AG2 (30µg/mL) contra CTL (DMEM), CTL+ (CCCP ((2-[2-(3-Chlorophenyl)hydrazinylydene]propanedinitrile)) através da marcação com JC-1 lida por citometria de fluxo. Baixos níveis da razão PE-A (vermelho)/Alexa fluos 488-A(verde) correspondem a redução de  $\Delta\Psi_m$ . Significância  $P < 0.0001$  (ANOVA).

## 5.5 Citoquímica

Através da marcação nuclear com DAPI, é possível observar uma modificação na estrutura/morfologia do núcleo celular principalmente no grupo AG2 - 30 µg/mL, onde observa-se fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos.

A marcação com mitotracker possui em sua composição clorometil levemente reativa a tiol, permitindo a retenção do composto no interior das mitocôndrias. Células com mitocôndrias viáveis são capazes de metabolizar a sonda mitotracker apresentando maior intensidade de fluorescência. Observa-se que a fluorescência verde é reduzida nos grupos tratados em comparação ao grupo Controle. Indicando redução de mitocôndrias celulares, um sinal inicial do processo apoptótico (Figura 8).

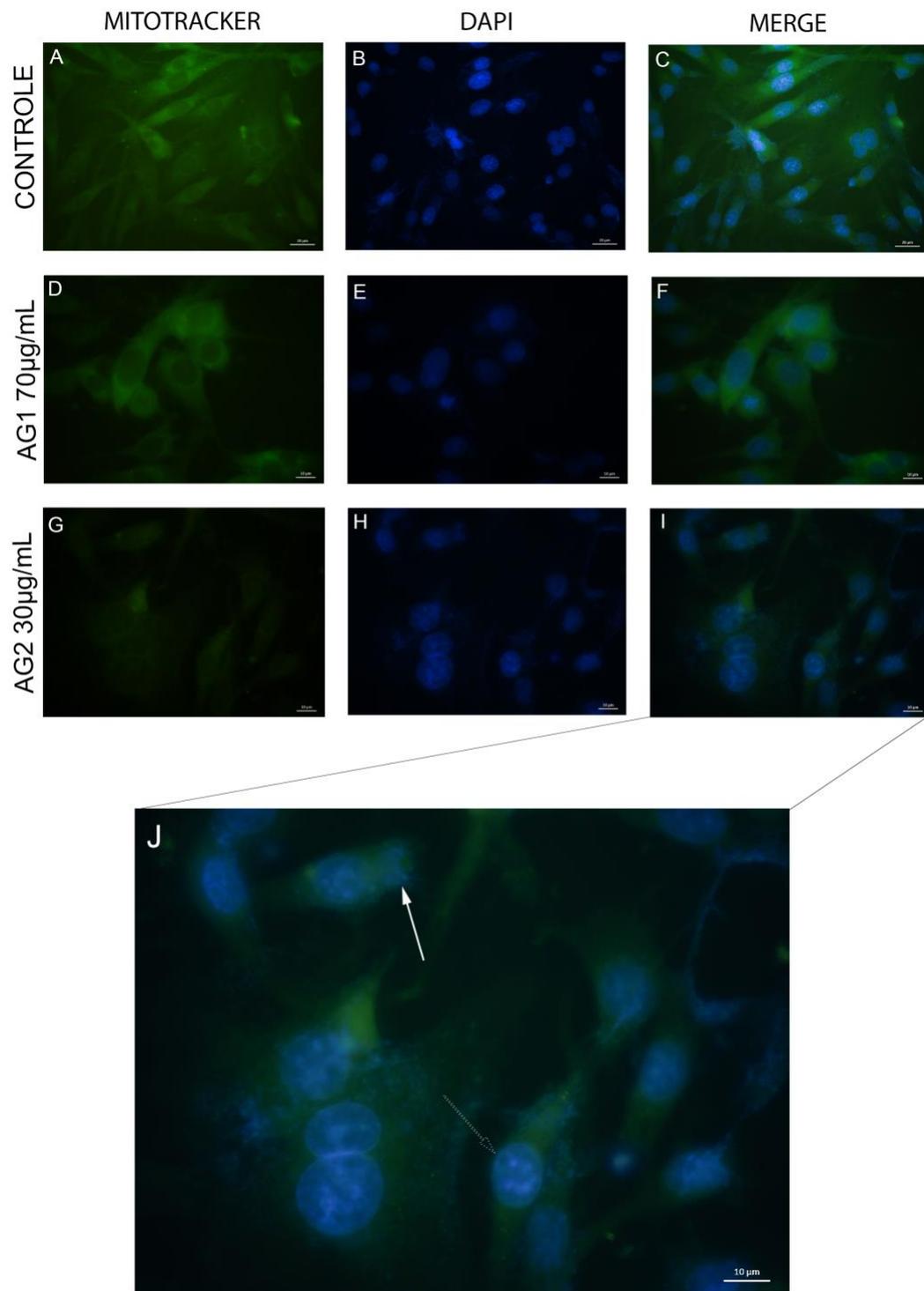


Figura 8 - Análise morfológica da marcação com as sondas DAPI (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI) e Mitotracker e imagens sobrepostas de ambas marcações em células C6. Grupos classificados em grupos Controle, AG1 70 µg/mL e AG2 30 µg/mL por 12h e analisados em microscópio de fluorescência. O Grupo tratado com AG2 (30 µg/mL) (G) apresentaram menor intensidade de fluorescência verde comparado com o AG1 (70 µg/mL) e controle. (J) Alterações morfológicas características do processo apoptótico após o tratamento com AG2 (30 µg/mL) por 12h. Imagens foram analisadas usando microscópio de fluorescência a magnificação 100x, setas brancas identificam fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos.

## 5.6 Western Blotting

A fim de investigar como se dá a apoptose celular através do tratamento com as AGs, amostras de proteínas celulares foram submetidas a técnica de Western Blotting.

Para este ensaio, os grupos controle e tratados foram marcados com Akt e p-Akt. Todos os grupos apresentaram bandas marcadas com Akt, sendo que os grupos AG2 na concentração 30 $\mu$ g/mL apresentou bandas mais pronunciadas. Todavia, a marcação com Akt fosforilada (pAkt) se apresentou reduzida em relação a akt (Figura 9).

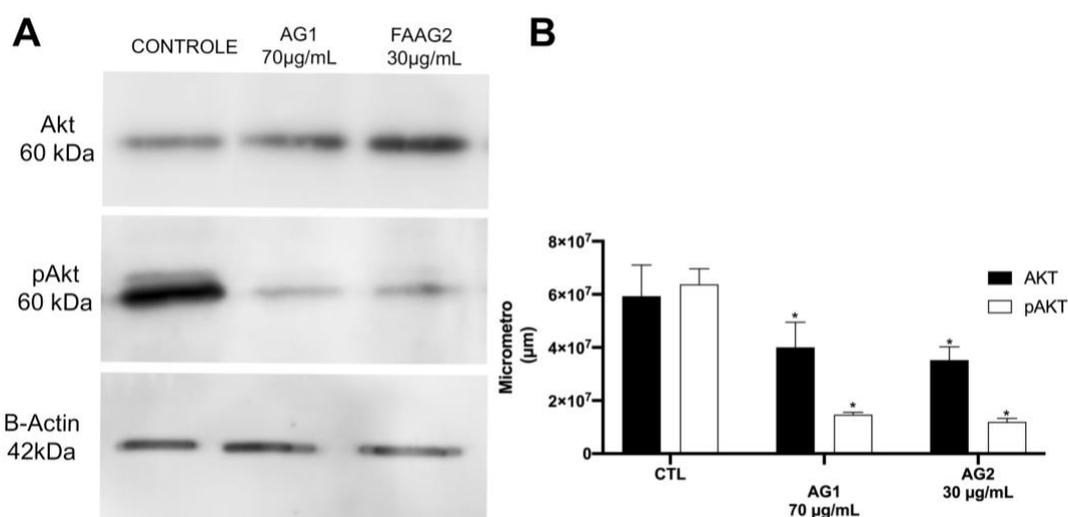


Figura 9 – Tratamento com AG1 70  $\mu$ g/mL e AG2 30  $\mu$ g/mL reduziram a fosforilação de Akt em células C6. A expressão proteica foi analisada por Western Blotting (A), bandas foram quantificadas usando o software image J (B). Os dados estão representados em média  $\pm$  DP \* $p < 0.001$ .

## 6 DISCUSSÃO

Muitos artigos encontrados na literatura enfatizam o potencial antineoplásico dos canabinóides, endocannabinóides e seus análogos (DOS SANTOS *et al.*, 2015; A. FRAGUAS *et al.*, 2018; MORENO *et al.*, 2019). As AGs analisadas neste trabalho são produzidas a partir dos ácidos graxos do óleo de andiroba e fazem parte da classe de n-aciletanolaminas (NAEs), que são moléculas sinalizadoras que interagem com o sistema endocannabinóide (EZZILI, 2010).

Embora vários trabalhos mostrem a atividade do óleo de andiroba e seus derivados em diversos tipos de câncer (DA SILVA *et al.*, 2008; PORFIRIS-DIAS *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2021), não há estudos que demonstrem sua atividade perante

cânceres cerebrais. O presente estudo mostrou pela primeira vez a ação de duas amidas graxas análogas a endocanabinóides, produzidas a partir dos ácidos graxos do óleo de andiroba contra células de glioma de ratos (C6), mostrando que essas substâncias reduziram a viabilidade celular dessas células de forma dose dependente e induziram à alterações celulares e apoptose.

As AGs testadas neste trabalho são capazes de reduzir a proliferação e viabilidade em células de glioma, ambas de maneira dose dependente em um intervalo de 12h, alcançando os valores de IC50 70µg/mL e 50µg/mL respectivamente para AG1 e AG2. Além disso, foi possível verificar, através de teste de viabilidade com glias e teste de hemólise que as AGs não matam as células normais saudáveis, comprovando assim o seu potencial e a seguridade do tratamento para as células saudáveis.

Esses resultados condizem com outros estudos que testaram os efeitos de outros endocanabinóides e análogos como AEA, 2-AG, (SEA) que também causam apoptose em culturas de células de glioma C6 (MACCARRONE, 2002; C. FOWLER, 2003, assim como em testes com Oleamida (OEA) em células RG2 de glioblastoma (TORRES-ROMÁN, 2020). Dentre elas, algumas estão presentes na composição das AGs, SEA (11.1% em AG1 e 5.5% em AG2) e OEA (52.6% em AG1 e 50.1% em AG2) (RODRIGUES DE OLIVEIRA, 2020).

O tratamento com as AGs reflete nas alterações na morfologia celular, observadas nas características apoptóticas tais como a formação de corpos apoptóticos, a vacuolização do citoplasma e condensação da cromatina. Esses achados são similares aos resultados obtidos por Ellert-Miklaszewska (2021) ao tratar culturas primárias de glioblastoma com os canabinoides sintéticos WIN55,212-2 e JWH133 durante 48h.

Verificou-se que as células tratadas com as AGs apresentam morte celular por apoptose. O mesmo tipo de morte celular pode ser observado em outros trabalhos como o de Ciaglia et al (2015), que testaram um antagonista do receptor CB1 em nas linhagens de glioma U343MG (U343), U87MG (U87), U251MG (U251) and T98G (T98). Similarmente, a co-administração de CBD e TMZ aumentam significativamente os efeitos pró-apoptóticos em linhagens de glioma, U87MG e MZC (Nabissi et al. 2013). Bem como, Chao Ma (2016) observou o aumento da população de células apoptóticas de maneira dose dependente após tratamento com AEA. Nesse contexto, é possível observar que as AGs se comportam de maneira similar a fitocanabinoides, endocanabinóides e outras substâncias similares já testadas contra o glioma.

A ação apoptótica das AGs também foi observada com o aumento da despolarização da membrana mitocondrial assim como foi observado com o uso de CBD (16 $\mu$ M) em monócitos humanos (WU et al.,2018), e o uso do canabinóide sintético WIN 55,212-2 em glioma C6 . Juntamente com esse resultado, observou-se a ativação da caspase 9 e da inibição de Erk1/2 (ELLERT-MIKLASZEWSKA, 2005).

Somado a isso, as AGs causam diminuição na integridade e função mitocondrial nas células C6. Na literatura, existem registros de canabinóides e similares que alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial em diferentes tipos celulares como monócitos, linfoma, carcinoma e neuroblastoma (WU et al, 2018; MACCARRONE et al, 2000; SALBINI et al,2021).

Em gliomas os canabinóides também causam alterações similares, despolarizando o potencial de membrana e/ou causando o desacoplamento mitocondrial (ELLERT-MIKLASZEWSKA et al. 2002, 2005; 2021; C.AMANTINI et al 2007). Recentemente, Gross (2021), observou uma redução no consumo de oxigênio e na inibição mitocondrial nas linhagens celulares testadas mediante ao tratamento com CBD, ratificando a alteração mitocondrial.

Akt é uma *serine threonine kinase* presente em vários tipos de câncer. Está envolvida nas vias de supressão da apoptose na qual ela se encontra na sua forma ativa (PAKT)(S.REVATHI DEVI et.al, 2019).

O presente estudo mostra, através da imunomarcacão com western blotting, que há uma menor quantidade de pAKT comparado a AKT em células tratadas com as AGs, sugerindo que essas amidas são capazes de prevenir o processo de evasão da apoptose comumente desenvolvido em cânceres para manutenção tumoral. Do mesmo modo, outros trabalhos mostram a mesma redução da fosforilação de AKT em linhagens de glioma e neuroblastoma humano e astrócitos de murino com o uso de CBD (SOLINAS et al., 2013; VRECHI et al., 2021).

Lavando em consideração as evidências apresentadas quanto a indução de morte por apoptose e a redução na expressão de pAKT, podemos inferir que a inibição de apoptose está possivelmente associada a via PI3k/AKT. Esses efeitos podem ser mediados pelos receptores CB1 e CB2 ou ainda os receptores não canônicos PPARg (Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama), TRPV 1 e 2 (Receptor vanilóide 1 e 2), que podem desempenhar papeis importantes na fisiopatologia do glioma e atuar como alvos terapêuticos (KHOO et al., 2013; CHINIGÒ, 2021). Apesar de não haver investigação dos mecanismos pelos quais as AGs exercem seus efeitos no

presente trabalho, podemos sugerir que a ativação do sistema endocanabinóide pelas AGs inibe as proteínas PI3k/AKT e BAD, levando a perda de integridade mitocondrial e liberação do citocromo C causando apoptose via caspase.

Diante dos dados aqui discutidos, podemos concluir que as AGs obtidas a partir do óleo de andiroba apresentam ação análoga aos endocanabinóides *in vitro* sendo de fato moléculas com potencial para tratamento de gliomas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MISHRA, A. *et al.* "Scientific validation of the medicinal efficacy of *tinospora cordifolia*", **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
2. AMANTINI, C., MOSCA, M., NABISSI, M., *et al.* "Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation", **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 3, p. 977–990, 2007.
3. ARTMANN, A., PETERSEN, G., HELLGREN, L. I., *et al.* "Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acyl ethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine", **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1781, n. 4, p. 200–212, 2008.
4. BARTH, R. F., KAUR, B. "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas", **Journal of Neuro-Oncology**, v. 94, n. 3, p. 299–312, 2009.
5. BATLLE, E., CLEVERS, H. "Cancer stem cells revisited", **Nature Medicine**, v. 23, n. 10, p. 1124–1134, 2017.
6. BATTISTA, N., MACCARRONE, M. **Basic Mechanisms of Synthesis and Hydrolysis of Major Endocannabinoids**. [S.l.], Elsevier Inc., 2017. v. 3.
7. BIFULCO, M., LAEZZA, C., PISANTI, S., *et al.* "Cannabinoids and cancer: Pros and cons of an antitumour strategy", **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 2, p. 123–135, 2006.
8. BLUTSTEIN, T., HAYDON, P. G. **The Tripartite Synapse. A Role for Glial Cells in Modulating Synaptic Transmission**. [S.l.], Elsevier, 2013.

9. BRAILE, M., MARCELLA, S., MARONE, G., *et al.* "The interplay between the immune and the endocannabinoid systems in cancer", **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1–25, 2021.
10. CHAKRABORTY, S., RAHMAN, T. "The difficulties in cancer treatment.", **Ecancermedalscience**, v. 6, p. ed16, 2012.
11. CHAMBERLIN, S. R., BLUCHER, A., WU, G., *et al.* "Natural product target network reveals potential for cancer combination therapies", **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. MAY, 2019.
12. CHANDA, D., NEUMANN, D., GLATZ, J. F. C. "The endocannabinoid system: Overview of an emerging multi-faceted therapeutic target", **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 140, p. 51–56, 2019.
13. CHINIGÒ, G.; CASTEL, H.; CHEVER, O.; GKIKI, D. TRP. "Channels in Brain Tumors". **Front Cell Dev Biol** 9, 617801, 2021.
14. CIAGLIA, E., TORELLI, G., PISANTI, S., *et al.* "Cannabinoid receptor CB1 regulates STAT3 activity and its expression dictates the responsiveness to SR141716 treatment in human glioma patients' cells", **Oncotarget**, v. 6, n. 17, p. 15464–15481, 2015.
15. CLARKE, M. F., HASS, A. T. **Cancer Stem Cells Keywords**. [S.l: s.n.], 2004.
16. DA SILVA, V. P., OLIVEIRA, R. R., FIGUEIREDO, M. R. "Isolation of limonoids from seeds of *Carapa guianensis* Aublet (meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography", **Phytochemical Analysis**, v. 20, n. 1, p. 77–81, 2009.
17. DAVIS, M. E. "Glioblastoma: Overview of disease and treatment", **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 20, n. 5, p. 1–8, 2016.
18. DESOUZA, R. M., SHAWWEIS, H., HAN, C., *et al.* "Has the survival of patients with glioblastoma changed over the years?", **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 2, p. 146–150, 2016.
19. DIMARZO, V., BIFULCO, M., DE PETROCELLIS, L. "The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation", **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 771–784, 2004.
20. DOS SANTOS, D. S., PIOVESAN, L. A., D'OCA, C. R. M., *et al.* "Antiproliferative activity of synthetic fatty acid amides from renewable resources", **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 340–347,

- 2015.
21. ELLERT-MIKLASZEWSKA, A., CIECHOMSKA, A. I., KAMINSKA, B. **Cannabinoid Signaling in Glioma Cells and Therapeutic implications.** [S.l.], Elsevier Inc., 2017.
  22. ELLERT-MIKLASZEWSKA, Aleksandra, CIECHOMSKA, I. A., KAMINSKA, B. "Synthetic cannabinoids induce autophagy and mitochondrial apoptotic pathways in human glioblastoma cells independently of deficiency in TP53 or pten tumor suppressors", **Cancers**, v. 13, n. 3, p. 1–21, 2021.
  23. ELLERT-MIKLASZEWSKA, Aleksandra, KAMINSKA, B., KONARSKA, L. "Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein", **Cellular Signalling**, v. 17, n. 1, p. 25–37, 2005.
  24. EZZILI, C., OTRUBOVA, K., BOGER, D. L. "Fatty acid amide signaling molecules", **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 20, p. 5959–5968, 2010.
  25. FONG, D., YEH, A., NAFTALOVICH, R., *et al.* "Curcumin inhibits the side population (SP) phenotype of the rat C6 glioma cell line: Towards targeting of cancer stem cells with phytochemicals", **Cancer Letters**, v. 293, n. 1, p. 65–72, 2010. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.12.018.
  26. FOSTER, I. "Cancer : A cell cycle defect", p. 144–149, 2008.
  27. FRAGUAS-SÁNCHEZ, A. I., MARTÍN-SABROSO, C., TORRES-SUÁREZ, A. I. "Insights into the effects of the endocannabinoid system in cancer: a review", **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 13, p. 2566–2580, 2018.
  28. GANIPINENI, L. P., DANHIER, F., PRÉAT, V. "Drug delivery challenges and future of chemotherapeutic nanomedicine for glioblastoma treatment", **Journal of Controlled Release**, v. 281, n. May, p. 42–57, 2018.
  29. GIAKOUMETTIS, D., KRITIS, A., FOROGLOU, N. "C6 cell line: The gold standard in glioma research", **Hippokratia**, v. 22, n. 3, p. 105–112, 2018. .
  30. GROBBEN, B., DE DEYN, P. P., SLEGERS, H. "Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion", **Cell and Tissue Research**, v. 310, n. 3, p. 257–270, 2002.
  31. GROSS, C., RAMIREZ, D. A., MCGRATH, S., *et al.* "Cannabidiol Induces Apoptosis and Perturbs Mitochondrial Function in Human and Canine Glioma

- Cells", **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. August, p. 1–12, 2021.
32. GUZMÁN, M. "Cannabinoids: Potential anticancer agents", **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 745–755, 2003.
33. HAMTIAUX, L., HANSOULLE, L., DAUGUET, N., *et al.* "Increasing antiproliferative properties of endocannabinoids in n1e-115 neuroblastoma cells through inhibition of their metabolism", **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.
34. HANIF, F., MUZAFFAR, K., PERVEEN, K., *et al.* "Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment", **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2017.
35. J. FOWLER, C., B. GUSTAFSSON, S., CHU CHUNG, S., *et al.* "Targeting the Endocannabinoid System for the Treatment of Cancer – A Practical View", **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 814–827, 2010.
36. KHOO, N. K. H., HEBBAR, S., ZHAO, W., *et al.* "Differential activation of catalase expression and activity by PPAR agonists: Implications for astrocyte protection in anti-glioma therapy", **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 70–79, 2013. DOI: 10.1016/j.redox.2012.12.006.
37. LAEZZA, C., PAGANO, C., NAVARRA, G., *et al.* "The endocannabinoid system: A target for cancer treatment", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 2020.
38. LEE, K. P., KIM, J. E., PARK, W. H., *et al.* "Regulation of C6 glioma cell migration by thymol", **Oncology Letters**, v. 11, n. 4, p. 2619–2624, 2016.
39. LIGRESTI, A., DE PETROCELLIS, L., DI MARZO, V. "From phytocannabinoids to cannabinoid receptors and endocannabinoids: Pleiotropic physiological and pathological roles through complex pharmacology", **Physiological Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1593–1659, 2016.
40. MA, C., WU, T. T., JIANG, P. C., *et al.* "Anti-carcinogenic activity of anandamide on human glioma in vitro and in vivo", **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 2, p. 1558–1562, 2016.
41. MACCARRONE, M., LORENZON, T., BARI, M., *et al.* "Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors", **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 41, p. 31938–31945, 2000.
42. MACCARRONE, Mauro, PAUSELLI, R., DI RIENZO, M., *et al.* "Binding,

- degradation and apoptotic activity of stearyl ethanolamide in rat C6 glioma cells", **Biochemical Journal**, v. 366, n. 1, p. 137–144, 2002.
43. MAUÉS, L. A. L., ALVES, G. M., COUTO, N. M. G., *et al.* "Flavonoids from the Amazon plant *Brosimum acutifolium* induce C6 glioma cell line apoptosis by disrupting mitochondrial membrane potential and reducing AKT phosphorylation", **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 113, n. December 2018, p. 108728, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108728.
44. MECHOULAM, R., HANUŠ, L. O., PERTWEE, R., *et al.* "Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond", **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 757–764, 2014.
45. MELO, K. M., OLIVEIRA, L. F. S., DA ROCHA, R. M., *et al.* "Andiroba oil and nanoemulsion (*Carapa guianensis* Aublet) reduce lesion severity caused by the antineoplastic agent doxorubicin in mice", **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 138, n. December 2020, 2021.
46. MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R., FASCINELI, M. L., ROLL, M. M., *et al.* "The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon", **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 248–256, 2016. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2015-0098. .
47. MIRANDA-FILHO, A., PIÑEROS, M., SOERJOMATARAM, I., *et al.* "Cancers of the brain and CNS: Global patterns and trends in incidence", **Neuro-Oncology**, v. 19, n. 2, p. 270–280, 2017. DOI: 10.1093/neuonc/now166. .
48. MORENO, E., CAVIC, M., KRIVOKUCA, A., *et al.* "The endocannabinoid system as a target in cancer diseases: Are we there yet?", **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. APR, 2019.
49. MOSMANN, T. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays", **RSC Advances**, v. 6, n. 80, p. 76600–76613, 1983. DOI: 10.1039/c6ra17788c.
50. OMURO, A., DEANGELIS, L. M. "Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review", **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 17, p. 1842–1850, 2013.
51. PALOCZI, J., VARGA, Z. V., HASKO, G., *et al.* **Neuroprotection in Oxidative Stress-Related Neurodegenerative Diseases: Role of Endocannabinoid System Modulation. Antioxidants and Redox Signaling.**

[S.l.], Mary Ann Liebert Inc. , 1 jul. 2018

52. PEARSON, J. R. D., REGAD, T. "Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme", **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. February, p. 1–11, 2017.
53. PORFÍRIO-DIAS, C. L., MELO, K. M., BASTOS, C. E. M. C., *et al.* "Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl) shows cytotoxicity but no mutagenicity in the ACPPO2 gastric cancer cell line", **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1060–1066, 2020.
54. PUCCI, C., MARTINELLI, C., CIOFANI, G. "Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges", **Ecancermedicalsecience**, v. 13, p. 1–26, 2019.
55. RAMER, R., SCHWARZ, R., HINZ, B. "Modulation of the endocannabinoid system as a potential anticancer strategy", **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. MAY, p. 1–17, 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00430. .
56. RAO, R. D., JAMES, C. D. "Altered molecular pathways in gliomas: An overview of clinically relevant issues", **Seminars in Oncology**, v. 31, n. 5, p. 595–604, 2004.
57. REVATHIDEVI, S., MUNIRAJAN, A. K. "Akt in cancer: Mediator and more", **Seminars in Cancer Biology**, n. April, 2019.
58. RODRIGUES de OLIVEIRA, F.; ELEUTERIO RODRIGUES, K.; HAMOY, M.; SARQUIS, Í. R.; OTAKE HAMOY, A.; CRESPO LOPEZ, M. E.; MACIEL FERREIRA, I.; MACCHI, B. DE M.; LUIZ MARTINS DO NASCIMENTO, J. Fatty Acid Amides Synthesized from Andiroba Oil (*Carapa Guianensis* Aublet.) Exhibit Anticonvulsant Action with Modulation on GABA-A Receptor in Mice: A Putative Therapeutic Option. **Pharmaceuticals** 2020, 13 (3), 43.
59. SAGAR, D. R., GAW, A. G., OKINE, B. N., *et al.* "Dynamic regulation of the endocannabinoid system: Implications for analgesia", **Molecular Pain**, v. 5, 2009.
60. SAILLER, S., SCHMITZ, K., JÄGER, E., *et al.* "Regulation of circulating endocannabinoids associated with cancer and metastases in mice and humans", **Oncoscience**, v. 1, n. 4, p. 272–282, 2014.
61. SALAZAR, M., CARRACEDO, A., SALANUEVA, Í. J., *et al.* "Cannabinoid

- action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells", **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 5, p. 1359–1372, 2009.
62. SALBINI, M., QUARTA, A., RUSSO, F., *et al.* "Oxidative stress and multi-organel damage induced by two novel phytocannabinoids, cbdb and cbdp, in breast cancer cells", **Molecules**, v. 26, n. 18, 2021.
63. SCHAUSS, A. G., WU, X., PRIOR, R. L., *et al.* "Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai).", **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604–10, 1 nov. 2006.
64. SHAHBAZI, F., GRANDI, V., BANERJEE, A., *et al.* "Cannabinoids and Cannabinoid Receptors: The Story so Far", **iScience**, v. 23, n. 7, p. 101301, 2020.
65. SHERGALIS, A., BANKHEAD, A., LUESAKUL, U., *et al.* "Current challenges and opportunities in treating glioblastomas", **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 3, p. 412–445, 2018.
66. SŁAWIŃSKA-BRYCH, A., ZDZISIŃSKA, B., KANDEFER-SZERSZEŃ, M. "Fluvastatin inhibits growth and alters the malignant phenotype of the C6 glioma cell line", **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 1, p. 121–129, 2014.
67. SOLINAS, M., MASSI, P., CINQUINA, V., *et al.* "Cannabidiol, a Non-Psychoactive Cannabinoid Compound, Inhibits Proliferation and Invasion in U87-MG and T98G Glioma Cells through a Multitarget Effect", **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.
68. SOLYMOSI, K., KOFALVI, A. **Cannabis: A Treasure Trove or Pandora's Box?** [S.l: s.n.], 2016. v. 17.
69. STOROZHUK, M. V., MOROZ, O. F., ZHOLOS, A. V. "Multifunctional TRPV1 Ion Channels in Physiology and Pathology with Focus on the Brain, Vasculature, and Some Visceral Systems", **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.
70. SVÍŽENSKÁ, I., DUBOVÝ, P., ŠULCOVÁ, A. "Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - A short review", **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 501–511, 2008.
71. SZALLASI, A., CORTRIGHT, D. N., BLUM, C. A., *et al.* "The vanilloid

- receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept", **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 5, p. 357–372, 2007.
72. VACCANI, A., MASSI, P., COLOMBO, A., *et al.* "Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism", **British Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 8, p. 1032–1036, 2005.
73. VELASCO, G., GALVE-ROPERH, I., SÁNCHEZ, C., *et al.* "Cannabinoids and ceramide: Two lipids acting hand-by-hand", **Life Sciences**, v. 77, n. 14, p. 1723–1731, 2005.
74. VRECHI, T. A. M., LEÃO, A. H. F. F., MORAIS, I. B. M., *et al.* "Cannabidiol induces autophagy via ERK1/2 activation in neural cells", **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 5434, 2021.
75. WANG, K., WANG, Q., LI, Q., *et al.* "Cannabinoid WIN 55,212-2 Inhibits Human Glioma Cell Growth by Triggering ROS-Mediated Signal Pathways", **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.
76. WU, H. Y., HUANG, C. H., LIN, Y. H., *et al.* "Cannabidiol induced apoptosis in human monocytes through mitochondrial permeability transition pore-mediated ROS production", **Free Radical Biology and Medicine**, v. 124, n. February, p. 311–318, 2018.
77. ZHOU, D. R., EID, R., MILLER, K. A., *et al.* "Intracellular second messengers mediate stress inducible hormesis and Programmed Cell Death: A review", **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1866, n. 5, p. 773–792, 2019.
78. ZUARDI, A. W. "History of cannabis as a medicine: A review", **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, n. 2, p. 153–157, 2006.