



**UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**DIAGNÓSTICO GENÉTICO E MOLECULAR**

**ENVOLVIMENTO DO GLUTAMATO NA SINALIZAÇÃO DE RADIORESISTÊNCIA**  
**EM GLIOBLASTOMAS HUMANOS EM CULTIVO**

Dissertação para obtenção do Título de  
Mestre em Diagnóstico Genético e Molecular

Clenara Docena

Orientadora: Dra. Adriana Brondani da Rocha

Canoas  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

### **Instituições onde foram realizados os estudos**

Laboratório de Marcadores de Estresse Celular, Prédio 22, 5<sup>o</sup> andar, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil.

Serviço de Neurocirurgia do Hospital Beneficência de Porto Alegre, RS, Brasil.

Serviço de Radioterapia do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho em especial a minha mãe, que apesar de todas as dificuldades sempre permitiu que todos os meus sonhos se tornassem realidade.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a minha orientadora Adriana, foi uma pessoa fundamental para realização deste trabalho. Durante toda a trajetória, sempre me tratou com muito respeito e dedicação. Serei eternamente grata por todo o apoio que me deste.

Aos meus tios, Emerson e Maria de Lourdes, por todo o apoio e incentivo que sempre demonstraram no decorrer de minha caminhada.

As minhas irmãs, pela paciência, carinho e dedicação de sempre.

Ao meu irmão Leonardo, pela disposição e apoio ao me ajudar sempre que necessário.

Ao meu namorado Rafael, por sempre estar ao meu lado.

Ao colega Carlos Alexandre Fedrigo, pelas explicações e ensinamentos sempre que dúvidas surgiam no laboratório.

A minha prima Sabrina, por todo o apoio, carinho e incentivo.

A minha mãe Marlene e ao meu padrasto Rubilar, pelo amor incondicional demonstrado em todos os momentos.

Ao meu pai Sideno, com saudades.

## Índice

1. Introdução.....	11
1.1 Tumores Primários do Sistema Nervoso Central.....	11
1.1.1 Caracterização.....	11
1.2 Gliomas.....	12
1.2.1 Prognóstico.....	14
1.2.2 Tratamento e Respostas.....	14
1.2.3 Alterações Moleculares.....	16
1.2.3.1 Glutamato e Gliomas .....	17
1.2.4 Resposta Celular à Radiação Ionizante e Mecanismos de Radioresistência.....	19
2. Objetivos.....	22
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1 Materiais .....	23
3.2 Métodos.....	24
3.2.1 Locais de Realização do Estudo.....	24
3.2.2 Obtenção das Amostras de Tumor.....	24
3.2.3 Preparo e Manutenção do Cultivo Celular.....	24
3.2.4 Tratamentos dos Cultivos Celulares com Radiação Ionizante.....	25
3.2.5 Tratamento dos Cultivos Celulares com Glutamato, DNQX ou BSO.....	25
3.2.6 Determinação do Efeito da Radiação ou Glutamato na Viabilidade Celular.....	26
3.2.7 Determinação do efeito do Glutamato, DNQX ou BSO na formação de colônias.....	26
3.2.8 Análise Estatística.....	26
4. Resultados.....	28
4.1 Caracterização da amostra.....	28
4.2 Efeito da Radiação Ionizante sobre a Proliferação Celular.....	30
4.3 Efeito da Radiação Ionizante sobre a Formação de Colônias Celulares.....	32
4.4 Efeito do Tratamento com Glutamato na Resposta Celular à Radiação Ionizante .....	34
4.4.1 Efeito do Tratamento com Glutamato na Proliferação Celular após	

Radiação Ionizante.....	34
4.4.2 Efeito do Tratamento com Glutamato na Fração de Sobrevivência após Radiação Ionizante .....	35
5. Discussão.....	39
6. Conclusões.....	44
7. Referências Bibliográficas.....	45
Anexos.....	55

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Estadiamento dos astrocitomas.....	13
Tabela 2. Características clínicas dos pacientes de onde foram obtidas as amostras para os cultivos de UGBM1 e UGBM2.....	29



## Lista de Figuras

Figura 1. Imagens obtidas por ressonância magnética dos dois pacientes do estudo.....	29
Figura 2. Características morfológicas dos cultivos de UGBM1, UGBM2 e U-87MG em monocamada.....	30
Figura 3. Número de células viáveis após irradiação dos cultivos de UGBM1 (A) e UGBM2 (B).....	32
Figura 4. Fração de sobrevivência dos cultivos de UGBM1 e UGBM2 irradiados com 2, 5 ou 10 Gy.....	33
Figura 5. Número de células viáveis após irradiação dos cultivos de UGBM1 (A) e UGBM2 (B) pré tratados ou não com glutamato.....	35
Figura 6. Fração de sobrevivência dos cultivos UGBM1 e UGBM2 após tratamento com glutamato (5mM) ou irradiação (5Gy).....	36
Figura 7. Fração de sobrevivência dos cultivos UGBM1 e UGBM2 após tratamento com glutamato (5mM), irradiação (5Gy) ou DNQX (500 $\mu$ M).....	37
Figura 8. Fração de sobrevivência dos cultivos UGBM1 e UGBM2 após tratamento com glutamato (5mM), irradiação (5Gy) ou BSO (25 $\mu$ M).....	38

## Resumo

Os gliomas correspondem a cerca de 50% das neoplasias cerebrais. Os glioblastomas (GBMs) são as formas mais malignas entre os tumores astrocísticos. Além da cirurgia, a radioterapia é a principal modalidade terapêutica para os pacientes portadores de GBMs. No entanto, o sucesso da radioterapia nos GBMs é frequentemente limitado pela resistência intrínseca dos GBMs. Tal comportamento é, sem dúvida, decorrente das alterações moleculares associadas a origem e progressão dos gliomas. Neste sentido, vários estudos demonstram que os tumores do SNC que apresentam maior liberação de glutamato possuem um comportamento mais agressivo, sugerindo que os receptores glutamatérgicos estejam envolvidos na origem e progressão dos gliomas malignos. Neste aspecto, a remoção do glutamato do meio intracelular envolve um sistema de transporte com captação de cistina e, a captação de cistina resulta na síntese do composto antioxidante glutathiona (GSH). A GSH é um sistema de detoxificação que desempenha importante papel na proteção das células contra danos induzidos pelos radicais livres, protegendo as células contra os efeitos da radiação ionizante. Considerando que o sistema de transporte dos aminoácidos glutamato e cistina é bastante atuante nos gliomas, a maior entrada de cistina na célula pode resultar em maior síntese de GSH, representando um possível mecanismo associado à radioresistência e progressão dos GBMs. Desta forma, no presente trabalho, buscamos avaliar o envolvimento do glutamato na sinalização da resposta dos GBMs à radioterapia. Para isto, utilizamos dois cultivos primários obtidos a partir de amostras de ressecção cirúrgica - UGBM1 e UGBM2. Os cultivos celulares foram submetidos à radioterapia (2, 5 e 10 Gy) e os efeitos imediatos (proliferação) e tardios (fração de sobrevivência) foram avaliados. Os resultados obtidos nestes experimentos demonstram que os cultivos de UGBM1 e UGBM2 apresentam sensibilidades diferentes à radiação ionizante tanto na sua resposta imediata quanto na tardia. Na dose de 2 Gy, o cultivo de UGBM2 sofreu inibição significativa na proliferação e fração de sobrevivência enquanto na UGBM1 não se observou efeito ( $p < 0,05$ ). Já nas doses de 5 Gy e 10 Gy, ambos os cultivos sofreram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ). O tratamento com glutamato (5 mM) induziu a proliferação dos cultivos quando utilizado como pré-tratamento à radioterapia (5 Gy), restabeleceu o comportamento da proliferação da UGBM1 e UGBM2 ao nível dos controles. No entanto, a adição do antagonista do receptor AMPA – DNQX (500  $\mu$ M) - restabeleceu os efeitos inibitórios da radiação ionizante (5 Gy) em ambos os cultivos celulares, indicando que os efeitos protetores do glutamato na resposta à radioterapia nos GBMs são mediados pelos receptores AMPA. Ainda, para investigarmos o mecanismo pelo qual o glutamato tornou os cultivos de GBMs mais tolerantes à radioterapia, as células foram pré-tratadas com o inibidor de GSH – o BSO (25  $\mu$ M). Nestes experimentos, verificamos que quando o BSO foi utilizado anteriormente aos tratamentos com glutamato e radiação ionizante, não ocorreu efeito protetor do glutamato (5 mM) quanto a radioterapia, sugerindo que a ação protetora induzida pelo glutamato à radioterapia em UGBM1 e UGBM2 envolve o sistema GSH.

## Abstract

Gliomas account for about 50% of brain neoplasms. Glioblastomas (GBMs) are the most malignant tumors among astrocytomas. In addition to surgery, radiotherapy is the main treatment for patients with GBMs. However, the success of radiotherapy in GBMs is often limited by intrinsic resistance of GBMs. Such behavior is undoubtedly due to the molecular changes associated with the origin and progression of gliomas. In this context, several studies show that GBM tumors with higher glutamate release have a more aggressive behavior, suggesting that glutamatergic receptors are involved in the origin and progression of malignant gliomas. In this respect, the removal of glutamate from the intracellular environment involves a system of transport of cystine uptake, and uptake of cystine results in the synthesis of the antioxidant compound glutathione (GSH). GSH is a detoxification system that plays an important role in protecting cells against damage induced by free radicals, protecting cells against the effects of ionizing radiation. Whereas the transport system of amino acids glutamate and cystine is very active in gliomas, the largest entry of cystine in the cell may result in increased synthesis of GSH, representing a possible mechanism associated with radioresistance and progression of GBMs. Thus, in the paper we assess the involvement of glutamate signaling in the response of GBMs to radiation therapy. For this, we used two primary cultures obtained from samples of surgical resection - UGBM1 and UGBM2. Tissue cultures were treated with radiotherapy (2, 5 and 10 Gy) and the immediate effects (proliferation) and late (fraction of survival) were evaluated. The results from these experiments show that the crops UGBM1 and UGBM2 have different sensitivities to ionizing radiation both in its immediate response and late. At a dose of 2 Gy, the cultivation of UGBM2 suffered significant inhibition in the proliferation and survival as a fraction of the UGBM1 there was no effect ( $p < 0.05$ ). Since the doses of 5 Gy and 10 Gy, both crops have suffered significant decrease ( $p < 0.05$ ). Treatment with glutamate (5 mM) induced the proliferation of crops when used as pre-treatment with radiotherapy (5 Gy) restored the proliferation behavior of UGBM1 and UGBM2 at the controls. However, the  $\mu$  - restored the  $\mu$  addition of the AMPA receptor antagonist - DNQX (500  $\mu$ M) inhibitory effects of ionizing radiation (5 Gy) in both cell cultures, indicating that the protective effects of glutamate in response to radiotherapy in GBMs are mediated by AMPA receptors. Still, to investigate the mechanism by which glutamate has GBM crops more tolerant to  $\mu$ radiation, cells were pretreated with the inhibitor of GSH - the BSO (25  $\mu$ M). In these experiments, we found that when the BSO was used before treatments with glutamate and ionizing radiation, there was no protective effect of glutamate (5 mM) and radiotherapy, suggesting that the protective action induced by glutamate in radiotherapy UGBM1 and UGBM2 involves system GSH.

## 1. Introdução

### 1.1 Tumores Primários do Sistema Nervoso Central

Os tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) possuem grande repercussão na infância, onde são as neoplasias sólidas mais frequentes e responsáveis por 20% de todos os tumores nesta faixa etária (DORAN & THORELL, 2003), sendo superados apenas pelas leucemias (GLOECKLER *et al.*, 2003). A incidência de tumores cerebrais primários tem aumentado expressivamente nas últimas décadas (BRANDES, 2003; REARDON & WEN, 2006), representando cerca de 2 a 3% de todas as neoplasias em seres humanos (WRENNSCH *et al.*, 2002; CHRISTENSEN *et al.*, 2003).

#### 1.1.1 Caracterização

Os tumores primários do SNC representam um grupo heterogêneo de neoplasias. Assim, mesmo tumores com características benignas são frequentemente letais devido a suas propriedades infiltrativas e tendência a ocorrer transformação maligna no decorrer do tempo (DEANGELIS, 2001; BEHIN *et al.*, 2003). O conhecimento incompleto da patogênese e da etiologia dos tumores malignos do SNC faz com que a maioria dos pacientes com diagnóstico positivo apresentem sobrevida média inferior a um ano (MICHAILOWSKY *et al.*, 2003; ROA *et al.*, 2004).

Os tumores primários do SNC podem se originar de células gliais (glioblastoma, astrocitoma e oligodendroglioma), células endimárias (ependimoma) ou tecido de suporte (meningioma, schwanoma e papiloma do plexo coróide). Na infância, também podem surgir de células mais primitivas, levando à formação de, por exemplo, neuroblastoma, meduloblastoma ou cordoma. Estas neoplasias aparecem desde as formas curáveis, tais como os meningiomas até as formas agressivas, com mau prognóstico, como os glioblastomas (GBMs).

Através dos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), os tumores do SNC são classificados de acordo com o grau de malignidade, características histológicas e alterações genéticas. A classificação histológica por categorias

representa uma forma de predizer o comportamento biológico de uma neoplasia, cujo resultado afeta diretamente o manejo clínico (LOUIS *et al.* 2007).

Desta forma, os tumores do SNC são divididos em grau I, II, III e IV. Os tumores de grau I são benignos e podem ser curados se retirados cirurgicamente. Apresentam um lento crescimento e ocorrem principalmente em crianças e adultos jovens. Os de grau II são tumores malignos de baixo-grau que já apresentam uma infiltração difusa, tornando-os incuráveis pela opção cirúrgica. Possuem um alto grau de diferenciação celular e crescimento lento. Os de grau III desenvolvem-se de astrocitomas de baixo-grau, mas possuem atividade mitótica e celular aumentadas. Apresentam uma maior proliferação em relação aos de grau II, sendo fatais em um espaço de tempo mais curto. Finalmente, os tumores de grau IV têm características mais avançadas de malignidade, incluindo proliferação vascular e necrose, e como apresentam resistência à radioterapia e quimioterapia, costumam ser letais em torno de 12 meses (FURNARI *et al.* 2007; SWARTLING, 2008).

## 1.2 Gliomas

Os gliomas englobam todos os tumores primários do SNC de origem glial (LENT, 2004) e, de acordo com sua origem, podem ser subdivididos em três subtipos: (1) Astrócitos - Astrocitomas; (2) Oligodendrócitos - Oligodendromas; (3) Ependimócitos - Ependimomas (SCHUNEMANN, 2006).

As células ependimais auxiliam a regular a difusão do fluido cérebro-espinhal dentro das regiões periventriculares do cérebro e, é através destas células que os tumores conhecidos como ependimomas são originados (RAO, 2003). Os oligodendrócitos também estão presentes de forma inerente no SNC. São células produtoras de mielina e envolvem os axônios, formando a bainha de mielina (LENT, 2004). Os oligodendrócitos podem dar origem a oligodendrogliomas que variam no prognóstico conforme características histológicas. Os astrócitos são a maior população celular do SNC e desempenham várias funções, entre elas o suporte estrutural aos neurônios e múltiplos papéis na fisiologia neural (LENT, 2004). Os astrocitomas são o tipo mais frequente de tumor primário do SNC (RAO, 2003).

Os astrocitomas podem ser subclassificados, conforme seu grau de malignidade, considerando-se características que incluem: morfologia celular, atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose. Desta forma, são

agrupados em gliomas de baixa (graus I e II) e alta malignidade (graus III e IV) (Tabela 1) (KLEIHUES *et al.*, 1993).

**Tabela 1.** Estadiamento dos astrocitomas

Denominação	Grau de Malignidade			
	I	II	III	IV
Astrocitoma pilocítico	X			
Astrocitoma pilomixóide		X		
Astrocitoma difuso		X		
Astrocitoma anaplástico			X	
Glioblastoma				X

(Modificada de LOUIS *et al.*,2007)

Os astrocitomas pilocíticos ocorrem com maior freqüência no cerebelo de crianças. Pacientes com este tipo de tumor que podem realizar cirurgia possuem um bom prognóstico, já que não são agressivos e normalmente mantêm seu estadiamento em grau I durante anos ou até décadas (COLLINS, 2004).

Os astrocitomas pilomixóides ocorrem tipicamente na região hipotalâmica ou quiasmática e ocorrem predominantemente em crianças com idade média de 10 meses. Apresentam um prognóstico menos favorável, motivo pelo qual foram enquadrados em grau II (LOUIS *et al.*,2007).

Os astrocitomas malignos de grau II possuem um pico de incidência entre 25 e 50 anos e uma média de sobrevivência de 7 anos, enquanto que os GBMs possuem um pico entre 45 e 70 anos (COLLINS,2004).

Já os astrocitomas anaplásicos (grau III) mostram elevada celularidade, ainda que as células tumorais mostrem características histológicas e imunocitoquímicas de astrócitos, sendo mais pleomórficas do que aquelas achadas em astrocitomas. Mostram atipia nuclear e apresentam atividade mitótica. Pacientes com este estadiamento de astrocitoma possuem expectativa de vida de 3-4 anos (COLLINS, 2004). Finalmente, os GBMs (grau IV) apresentam células com um amplo espectro morfológico, podendo ser bastante pleomórfico com formas gigantes, ou mantendo características fenotípicas dos astrócitos (COLLINS, 2004).

Os gliomas de alto grau são agressivos, altamente invasivos e neurologicamente destrutivos, sendo considerados os mais letais entre os tumores humanos (MILLER & PERRY, 2007). Esta invasividade é caracterizada por uma

intensa infiltração na neurógliã, que em gliomas de alto grau, pode apresentar proliferação microvascular e necroses (CLAES *et al.*, 2007).

Na população adulta, o GBM é um dos tumores cerebrais primários mais comuns, representando 50% de todos os gliomas primários no SNC. A grande maioria dos GBMs desenvolvem-se muito rapidamente, sem evidência clínica, radiológica ou morfológica de uma lesão menos maligna. Talvez o maior mistério para a compreensão dos GBMs é entender como e quando estas alterações genéticas e cascatas de sinalização interagem (KANU *et al.*, 2009).

### 1.2.1 Prognóstico

Apesar dos avanços nas técnicas de diagnóstico e tratamentos, o prognóstico para pacientes com glioma de alto grau permanece sombrio. A maioria dos pacientes morrem com menos de 2 anos de diagnóstico desta doença. As anormalidades moleculares são as grandes responsáveis por este prognóstico e, além disso, a variabilidade de anormalidades de paciente para paciente contribuem ainda mais para as dificuldades terapêuticas. De fato, uma das características que distinguem os gliomas é a sua genética heterogênea (REARDON & WEN, 2006; KANU *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Tratamento e Respostas

Os gliomas podem ser tratados com cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. A cirurgia representa o tratamento de primeira linha para os pacientes com tumores cerebrais. A escolha do método cirúrgico está relacionada com as características do tumor, determinados usualmente por biópsia para o diagnóstico histológico. A ressecção cirúrgica radical está associada com maior sobrevida e melhora da função neurológica, sugerindo que a remoção da maior quantidade tumoral possível é indicada (DEANGELIS, 2001).

O maior obstáculo para o uso da quimioterapia nos tumores cerebrais é o fato da barreira hemato-encefálica excluir muitos agentes do SNC. Por isso, novos métodos que permitam a passagem de drogas através da barreira têm se mostrado como um desafio, a fim de que altas concentrações de agentes quimioterápicos cheguem às células tumorais, evitando os efeitos sistêmicos adversos destes

medicamentos (MISRA *et al.*, 2003; GARCION *et al.*, 2006; SAWYER, 2006). Poucos compostos, como as nitrosuréias (carmustina e lomustina) e a temozolomida (TMZ), tem a habilidade de cruzar a barreira hemato-encefálica (MASON *et al.*, 2005).

A utilização da TMZ concomitante a radioterapia tem mostrado uma boa resposta no tratamento do GBM, resultando numa sobrevida média mais longa nos pacientes (14,6 versus 12,1 meses) e, uma maior taxa de sobrevivência, (26,5% versus 10,4%) (STUPP *et al.*, 2005). A TMZ tem muitas vantagens sobre outros agentes alquilantes. TMZ é uma pequena molécula lipofílica com um tamanho molecular de 194 Da, e assim, pode ser administrado oralmente e cruzar a barreira hemato-encefálica efetivamente (KANZAWA, 2004). A vincristina também é uma droga bastante utilizada, isolada ou associada a outros quimioterápicos (LEVIN *et al.*, 2000).

De todos os tratamentos adjuvantes, a radioterapia é o mais efetivo no aumento da sobrevida dos pacientes com GBM. A radioterapia costuma acompanhar o procedimento cirúrgico, com o objetivo de diminuir a massa tumoral e aumentar a sobrevida (KLEIHUES, 2000). Seguindo cirurgias de redução do volume, a radioterapia é o suporte principal de tratamento que dobra a média de sobrevivência de 6 para 12 meses (SARKARIA, 2006). Ainda que a radioterapia seja uma modalidade de tratamento muito utilizada no manejo clínico das neoplasias do SNC e a principal forma terapêutica adjuvante em astrocitomas malignos e GBMs (PETERSEN *et al.*, 2000; HUSSAINI *et al.*, 2002), as respostas terapêuticas destes tumores são tipicamente heterogêneas e incompletas, e freqüentemente acompanhadas por desenvolvimento de resistência tumoral (HUSSAINI *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2007).

De um modo geral, as modalidades de tratamento dos gliomas de alto grau são limitadas graças ao seu padrão de crescimento e características moleculares. Sua grande capacidade de invasão restringe a abordagem cirúrgica, limitando as ações da radioterapia, quimioterapia e mais recentemente, das terapias experimentais. Portanto, mesmo que os pacientes com gliomas de baixo grau possam sobreviver por vários anos, inevitavelmente irão falecer, normalmente após uma progressão a tumores de alto grau de malignidade (CLAES *et al.*, 2007).



### 1.2.3 Alterações Moleculares

A biologia dos gliomas malignos geralmente está associada com a expressão das proteínas que controlam o ciclo celular, com mecanismos complexos de interações genéticas e vias de sinalização promovidas por receptores tirosina quinase. Podem existir alterações em cada uma dessas vias, que de forma independente ou em conjunto, levam a perda de regulação do ciclo celular, a angiogênese, proliferação, invasão e resistência aos tratamentos (KANU *et al.*, 2009).

A alteração oncogênica mais frequente é a amplificação do rEGF (receptor epidérmico de fator de crescimento), resultando na superexpressão de sua proteína, um receptor com atividade tirosina quinase. A ativação da cascata desencadeada pelo rEGF desencadeia vias de sinalização que culminam com a indução da proliferação celular, angiogênese, invasão e bloqueio da apoptose. A maioria dos GBMs também contém o gene mutante *EGFRvIII* (HEIMBERGER, 2005).

A perda da heterozigose (LOH) no cromossomo 10q é frequente em GBMs. Neste cromossomo podem ser identificados vários genes supressores tumorais, como *PTEN*, *DMBT1*, *FGFR2*, *MGMT*, que estão envolvidos no controle do ciclo celular e reparação do DNA. A inativação de um gene supressor tumoral deve ocorrer em homozigose para que ele perca sua funcionalidade completamente. No GBM uma cópia de *PTEN*, *DMBT1*, *FGFR2* e/ou *MGMT* se perdem normalmente por LOH 10q e a outra cópia do gene está sujeita a mutações ou a processos epigenéticos que o inativam (FRANCO-HERNANDEZ *et al.*, 2007).

As vias genéticas *TP53/MDM2/P14* e *CDK4/RB1/P16*, implicadas na divisão celular, também se encontram desreguladas nos GBMs. O gene *MDM2*, cujo produto é uma oncoproteína que diminui a transcrição do gene *TP53*, pode ser encontrado amplificado ou superexpresso, influenciando a progressão do ciclo celular e a multiplicação do DNA lesado, através da inibição do *TP53*. A perda de homozigose e/ou a amplificação de *CDK4* leva a fosforilação inapropriada de RB1, que, em consequência, produz uma divisão celular descontrolada (KANU *et al.*, 2009).

### 1.2.3.1 Glutamato e Gliomas

Além das alterações moleculares classicamente identificadas e estudadas em gliomas, a alteração da sinalização do SNC associada ao glutamato é um tema de grande investigação. Vários estudos sugerem que o glutamato desempenha um papel central na proliferação, na manutenção celular de GBMs e na invasão dos tecidos adjacentes às células tumorais (YE *et al.*, 1999; YE & SONTHEIMER, 1999; RZESKI *et al.*, 2001; TAKANO *et al.*, 2001; ISHIUCHI *et al.*, 2002; D'ONOFRIO *et al.*, 2003; ARCELLA *et al.*, 2005; CHUNG *et al.*, 2005; GROOT *et al.*, 2005; ISHIUCHI *et al.*, 2007; LYONS *et al.*, 2007; SCHUNEMANN *et al.*, 2009).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório de mamíferos (FONNUM, 1984). Este aminoácido possui uma ampla distribuição no SNC onde exerce seus efeitos excitatórios através da ativação de receptores específicos presentes nas membranas pré e pós-sinápticas das células neurais (WATKINS, 2000). São conhecidas duas classes de receptores glutamatérgicos: (1) Receptores metabotrópicos (mGlu), ligados a ativação de segundos mensageiros via proteína G (CARTMELL & SCHOEPP, 2000); (2) Receptores ionotrópicos, ligados ao transporte iônico transmembrana. A classe de receptores ionotrópicos pode ainda ser subdividida em receptores NMDA e não-NMDA (AMPA e Kainato) de acordo com sua permeabilidade iônica, tempo de ativação e desensibilização ao glutamato (DINGLELINE *et al.*, 1999).

Dos cinco subtipos de transportadores de alta afinidade pelo sódio, dois deles - GLAST e GLT1 são encontrados apenas no SNC (ROTHSTEIN *et al.*, 1994). Ambos são considerados transportadores astrogliais (ANDERSON & SWANSON, 2000) e os principais responsáveis pela recaptção do glutamato do meio extracelular (ROTHSTEIN *et al.*, 1996). Os outros três transportadores, EAAC1, EAAT4 e EAAT5 são expressos em neurônios em localizações preferencialmente extra sinápticas (GEGELASHVILI *et al.*, 2000). Quanto aos transportadores não dependentes de sódio sua principal função é a manutenção dos níveis intracelulares do antioxidante glutathiona (GSH) via recaptção de cistina, precursor para a síntese de GSH e da liberação de glutamato numa proporção cistina: glutamato de 1:1 (BENDER *et al.*, 2000).

Em situações onde o glutamato permanece por tempo prolongado, ou em concentrações elevadas na fenda sináptica, se observa produção de danos celulares provocados pelo excesso da estimulação dos receptores glutamatérgicos, fenômeno conhecido como excitotoxicidade (LIPTON, 1999; MELDRUM, 2000). A excitotoxicidade nos neurônios é mediada principalmente por receptores NMDA (CHOI, 1988), enquanto nas células da glia ocorre via receptores não-NMDA e carreador cistina:glutamato (CHEN *et al.*, 2000; MATUTE *et al.*, 2002).

No que diz respeito à sensibilidade a toxicidade glutamatérgica também há diferenças entre os subtipos de células neuronais. Enquanto doses de 100  $\mu$ M in vitro são suficientes para provocar danos excitotóxicos em neurônios, as células da glia resistem a concentrações próximas a 1 mM de glutamato sem apresentar toxicidade acentuada (LI *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2000). A excitotoxicidade tem sido comumente associada ao processo fisiopatológico de diferentes doenças cerebrais agudas e crônicas, tais como: Alzheimer, traumatismos crânio encefálicos e acidentes vasculares encefálicos (LIPTON & ROSENBERG, 1994).

Várias evidências experimentais indicam que os GBMs possuem uma capacidade de recaptação limitada de glutamato do meio extracelular, como resultado da ausência de transportadores de glutamato dependentes de sódio, GLAST e GLT1, em suas membranas celulares (YE *et al.*, 1999). Ainda, os GBMs são capazes de sintetizar e liberar glutamato ativamente para o meio extracelular através do carreador cistina: glutamato, existindo uma correlação positiva entre a capacidade de liberação de glutamato e o crescimento tumoral (YE *et al.*, 1999; YE & SONTHEIMER, 1999). Segundo TAKANO (2001), esta correlação entre liberação de glutamato e crescimento tumoral poderia ser explicada pelo efeito excitotóxico do glutamato sobre as células sadias adjacentes ao tumor, o que possibilitaria a expansão tumoral. Todavia, não pode ser descartada a existência de um efeito autócrino ou parácrino do glutamato sobre as próprias células tumorais (TAKANO *et al.*, 2001; ISHIUSCHI *et al.*, 2002; ARCELLA *et al.*, 2005, ISHIUCHI *et al.*, 2007). De fato, o uso de antagonistas dos receptores NMDA e dos receptores AMPA reforça esta idéia ao demonstrar que sua utilização diminui o crescimento tumoral de gliomas (RZESKI *et al.*, 2001).

Da mesma forma que os receptores ionotrópicos, a presença de receptores metabotrópicos ligados a proteína G em GBMs também parece estar envolvida na manutenção da viabilidade tumoral (ARONICA *et al.*, 2003; D'ONOFRIO *et al.*, 2003;

ARCELLA *et al.*, 2005). Neste sentido, o antagonismo dos receptores metabotrópicos promoveu a inibição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* (D'ONOFRIO *et al.*, 2003; ARCELLA *et al.*, 2005). Dentre os oito subtipos de receptores metabotrópicos, pelo menos dois, são encontrados na membrana celular de gliomas (ARONICA *et al.*, 2003; D'ONOFRIO *et al.*, 2003). Estes receptores ligados a proteína G participam da ativação de diversas vias intracelulares de sinal, como a proteína-kinase ativada por mitógenos (MAPK) e do fosfatidiliinositol-3-fosfato (PI3K)/ Akt, através da ativação de segundos mensageiros como a guanina trifosfato (GTP). A associação entre esta via de sinalização e o glutamato tem sido investigada em vários estudos. Um trabalho verificou que a ativação dos receptores de AMPA induzida pelo glutamato promove aumento na expressão do gene *erbB1* que codifica receptores de fatores de crescimento, dentre eles o rEGF (DZIEDZIC *et al.*, 2003). Mais recentemente, outro estudo mostrou que a ação promotora de crescimento do glutamato nos GBMs envolve a ativação da via do AKT (ISCHIUCHI *et al.*, 2007). Ainda, num trabalho conduzido em nosso laboratório verificamos que o tratamento com glutamato promove aumento no conteúdo de AKT fosforilado na linhagem de GBM U-87MG via ativação da PI3K (SCHUNEMANN *et al.*, 2009).

#### 1.2.4 Resposta Celular à Radiação Ionizante e Mecanismos de Radioresistência

A radiação ionizante induz perturbações na progressão das células através do ciclo celular, envolvendo a indução e supressão de produtos gênicos envolvidos na progressão do ciclo (WILLIAMS *et al.*, 2008).

De um modo geral, quando uma célula eucariótica sofre algum dano associado ao DNA pode: a) parar a síntese de DNA, permitindo que ocorra o reparo; b) continuar o processo de replicação e passar seu erro adiante; ou c) ativar rotas que sinalizam para sua morte celular. A seleção destas opções é denominada resposta ao dano de DNA (DNA Damage Response - DDR), que se constitui numa complexa rede de vias de sinalização (COHN & D'ANDREA, 2008).

Um evento bastante importante na DDR é a rápida resposta de complexos protéicos originando cromatina na região onde houve este dano. Assim que estas proteínas são unidas em cromatina, estes complexos fornecem uma atividade de checagem para parar a replicação do DNA ou acionar o reparo das bases danificadas do DNA. Aqui, mais uma vez, a interferência na atuação e elaboração

destes complexos protéicos acarreta em instabilidade genômica, e em muitos casos, predispõem as células a transformações malignas (COHN & D'ANDREA, 2008).

Fótons de radiação ionizante podem ser absorvidos por moléculas como riboflavina, porfirinas e proteínas do grupo heme, podendo causar dano ao DNA, membranas e proteínas, tanto por reações diretas quanto pela produção de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species – ROS). No caso da criação de ROS, estas podem originar peróxido de hidrogênio, que podem produzir radicais hidroxila, altamente reativos, capazes de originar quebras de fita simples ou dupla no DNA (MCMILLAN et al., 2008).

Na prática clínica, no tratamento de tumores cerebrais, a quantidade de radiação ionizante é calculada pela tolerância dos tecidos normais ao redor do tumor, já que os danos causados envolvem células e tecidos de vários tipos (FIKE et al., 2007).

Quando irradiadas, muitas células tumorais podem sofrer apoptose, um mecanismo de morte celular programada, caracterizada por rápida perda de integridade da membrana plasmática, fragmentação de DNA e expressão de inúmeros genes. No entanto, tumores, como o GBM, respondem com limitada eficácia à radioterapia, o que é atribuído à radioresistência intrínseca destas neoplasias (HUSSAINI et al., 2002; ROCHA et al., 2004; CHANG et al., 2007; NODA et al., 2009). Neste sentido, diversos fatores de crescimento, seus receptores e vias de sinalização que bloqueiam a apoptose tem sido associados a maior tolerância à radiação ionizante dos gliomas de alto grau (JOKI et al., 2001; BOGLER & WELLER, 2002; YAO et al., 2003; GOLDING et al., 2009; MUKHERJEE et al., 2009; RLI et al., 2009). Contudo, em relação ao papel do glutamato no comportamento radioresistente dos GBMs, até o presente, não existem estudos disponíveis. Certamente, os mecanismos associados a radioresistência intrínseca dos GBMs devem incorporar diversas das alterações moleculares dos gliomas malignos e assim, culminar num fenótipo de baixa tolerância aos efeitos da radiação ionizante. Não se pode esperar que apenas algumas moléculas e vias sejam as responsáveis por este comportamento, no entanto, a maior disponibilidade de informações poderá nos levar a construção das vias de sinalização relacionadas a radioresistência e identificação de alvos terapêuticos contra os GBMs.

A GSH e seus complexos enzimáticos funcionam como um sistema de detoxificação que desempenha importante papel na proteção das células contra

danos induzidos pelos radicais livres e desta forma, podem proteger as células contra os efeitos da radiação ionizante (O'BRIEN & TEW, 1996; ZHONG *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2006; ZENGIN *et al.*, 2009). A liberação de glutamato pelos gliomas ocorre associada ao sistema de captação de cistina (sistema Xc) via um transportador de aminoácido expresso na membrana plasmática (SATO *et al.*, 1999; YE & SONTHEIMER, 1999) e a cistina é um aminoácido precursor na síntese do agente redutor GSH. A inibição farmacológica do sistema Xc inibe a produção de GSH e diminui expressivamente o crescimento dos tumores cerebrais *in vivo* (CHUNG *et al.*, 2005). Além disso, o conteúdo de GSH e seus sistemas, tem sido relacionado ao padrão de comportamento dos gliomas em resposta a tratamentos que induzem estresse oxidativo (ZENGIN *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2006). A maior entrada de cistina na célula pode resultar em maior síntese de GSH, representando um possível mecanismo associado a radioresistência e progressão dos GBMs promovidos pelo glutamato.

## 2. Objetivos

- Determinar o efeito da radiação ionizante sobre o crescimento dos cultivos primários derivados de GBM – UGBM1 e UGBM2.
- Identificar os perfis de sensibilidade à radiação ionizante dos cultivos UGBM1 e UGBM2.
- Avaliar o efeito do tratamento com dose não excitotóxica de glutamato sobre a resposta celular dos GBM após radiação ionizante.
- Determinar o efeito do antagonista do receptor de AMPA – DNQX - na resposta celular induzida pelo glutamato após radiação ionizante.
- Investigar o efeito do inibidor de GSH – BSO - na resposta celular induzida pelo glutamato após radiação ionizante.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais

O meio de cultivo utilizado neste estudo foi o D-MEM/F12 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O soro fetal bovino (FCS) foi obtido da Cultilab Campinas, SP, Brasil. A tripsina/EDTA foi obtida da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de alto grau de pureza. O glutamato, DNQX e o BSO foram obtidos da Sigma (St. Louis, NY, EUA).

A linhagem empregada num dos experimentos é derivada de GBM humano U-87MG (GBM) adquirida através da American Type Culture Collection – ATCC (Rockville, MD, EUA).

A lavagem das células foi realizada com Solução Salina Tamponada de Hank (HBSS: Sigma Chemical Co St. Louis, NY, EUA) e a homogeneização realizada com Solução Salina Fosfato Tamponada (PBS) composta por 0,9% de NaCl (p/v), 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM de NaH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4.

O material utilizado nas culturas foi lavado com Extran Alcalino (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), enxaguado com água da torneira (6 vezes) seguido de água destilada (5 vezes). Posteriormente, foi autoclavado a 120°C, 1 atm por 40 min (vidraria), 30 min (material plástico), ou 20 min (filtro com membrana de 0,2 µm). Após serem lavados e esterilizados, os materiais foram mantidos em estufa a 120°C (vidraria) ou 50°C (plástico) até o momento de serem utilizados.

Os meios de cultura, salinas e demais soluções foram preparados com água obtida de sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil). As soluções utilizadas nas culturas foram esterilizadas através de filtração em membrana de 0,2 µm. A esterilidade destas soluções foi testada, 24h antes do uso, em caldo tripton de soja (Unipath Ltda., Hampshire, Reino Unido) a 37°C.

A autoclave foi periodicamente monitorada para identificação de microorganismos com kit para teste de autoclave ATTEST1262 (3M Healthcare, St. Paul, MN, EUA).



## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Locais de Realização do Estudo

A cirurgia e acompanhamento dos pacientes foram realizados no Hospital Beneficência Portuguesa em Porto Alegre, RS. Os cultivos celulares, os tratamentos e as avaliações de respostas celulares foram realizados no Laboratório de Marcadores de Estresse Celular do Prédio 22, 5º andar, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS. A radioterapia foi realizada no Serviço de Radioterapia do Hospital São Lucas da PUCRS em Porto Alegre, RS.

### 3.2.2 Obtenção das Amostras de Tumor

Os dois cultivos primários de GBM, denominados UGBM1 e UGBM2, foram produzidos a partir de amostras coletadas de dois pacientes do sexo masculino, de 49 e 66 anos, respectivamente. A cirurgia e acompanhamento dos pacientes foram realizados no Hospital Beneficência Portuguesa de Porto Alegre. O espécime de tumor foi transportado ao laboratório para o isolamento das células.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ULBRA (Anexo 1). Ambos os pacientes assinaram um termo de consentimento, autorizando o uso das amostras cirúrgicas para estudo (Anexo 2).

### 3.2.3 Preparo e Manutenção do Cultivo Celular

O cultivo celular primário foi estabelecido de acordo com FARR-JONES (1999). Após a biópsia, fragmentos de aproximadamente 3 mm foram encaminhados ao laboratório para processamento. As amostras foram dissociadas mecanicamente, excluindo-se o estroma e os vasos. As células foram incubadas em EDTA/ tripsina por 20 minutos e centrifugadas a 1400 rpm durante 10 minutos. O pellet celular foi semeado em frascos de cultivo contendo meio DMEN/F12, 20% de soro fetal bovino (FCS) e aminoácidos não essenciais. Os cultivos celulares foram mantidos a uma temperatura de 37°C, a umidade relativa mínima de 95%, e a atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Os experimentos foram realizados após estabilização dos cultivos em meio de cultivo com apenas 0,5% de FCS. Para isto, os cultivos foram sofrendo trocas de meio com diminuição na concentração de FCS durante 7 dias de cultivo. Todos os experimentos foram realizados com células depois de 50 passagens e o crescimento celular superior ao estado de confluência foi controlado por remoção das células do frasco de cultura, utilizando solução de tripsina/EDTA.

A viabilidade celular maior que 95% foi confirmada pelo teste de exclusão azul de trypan.

#### 3.2.4 Tratamento dos Cultivos Celulares com Radiação Ionizante

O tratamento com radiação ionizante foi realizado através da exposição dos cultivos em semi-confluência de UGBM1 e UGBM2 mantidos em frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Nestas condições, as células foram tratadas com doses de 2, 5 e 10 Gy de radiação ionizante, com tempos de exposição de 1'76'', 4'39'' e 8'79'', respectivamente, utilizando-se um acelerador linear Telecobalto Theratron Phoenix Philips SR 7510 (Eindhoven, Holanda), com uma distância fonte-campo de 70 cm. Este tratamento foi realizado no Serviço de Radioterapia do Hospital São Lucas da PUCRS em Porto Alegre.

#### 3.2.5 Tratamentos dos Cultivos Celulares com Glutamato, DNQX ou BSO

Os cultivos de UGBM1 e UGBM2 foram tratados com glutamato ou DNQX (6,7-Dinitroquinoxalina-2,3-dione) por 48 horas com concentrações estabelecidas em estudos prévios do laboratório. O L-buthionina-SR-sulfoximina (BSO) foi utilizado como pré-tratamento de 24 horas em relação ao glutamato e igualmente empregado-se dose previamente estabelecida. O glutamato foi diluído em meio de cultura contendo 0,5% de FCS para obter uma concentração final de 5 mM de glutamato. O DNQX também foi diluído em meio de cultivo com 0,5% de FCS com ou sem 5 mM de glutamato na concentração de 500 µM de DNQX. O BSO foi dissolvido em DMSO e diluído em meio de cultura com 0,5% de FCS, obtendo concentração de 25 µM de BSO.

### 3.2.6 Determinação do Efeito da Radiação ou Glutamato na Viabilidade Celular

Para analisar o efeito imediato da radiação ou glutamato, avaliamos o número de células viáveis a cada 24 horas durante 6 dias, utilizando-se o método de exclusão por trypan blue. Assim, as células tratadas e não tratadas foram inoculadas na densidade de 1500 células/ well em placas de 24 wells.

A cada 24 horas, os cultivos foram incubados com 0,4% de trypan blue por 10 minutos. As células coradas e não coradas foram quantificadas em hemocítmetro em microscópio invertido. A viabilidade celular foi expressa a partir da razão entre as células coradas e não coradas. Através desses achados se pode determinar a proliferação celular dos cultivos.

### 3.2.7 Determinação do efeito do Glutamato, DNQX ou BSO na formação de colônias

Para avaliar o efeito tardio da radiação ou dos tratamentos com glutamato, DNQx ou BSO, determinamos a formação de colônias nos cultivos de UGBM1 e UGBM2. Para isto, as células tratadas e não tratadas foram inoculadas em placas de cultivo de 6 wells, na densidade de 400 células/well.

Após a inoculação, as placas foram mantidas em incubadora, à temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 95%, por 14 dias. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

Após o término dos 14 dias, as células foram fixadas com etanol 70% a 4°C e coradas com cristal violeta 0,1% para contar o número de colônias formadas. Foram consideradas as colônias com mais de 50 células, e a fração de sobrevivência (SF) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$SF = \frac{\text{Número de colônias nas células tratadas}}{\text{Número de colônias nas células controle}} \times 100$$

### 3.2.8 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes em triplicata. A análise estatística dos dados foi realizada através do teste t de Student com p<0,05.

As análises foram realizadas através de programa estatístico InStat versão 3.01 (Graphpad,USA).

## 4. Resultados

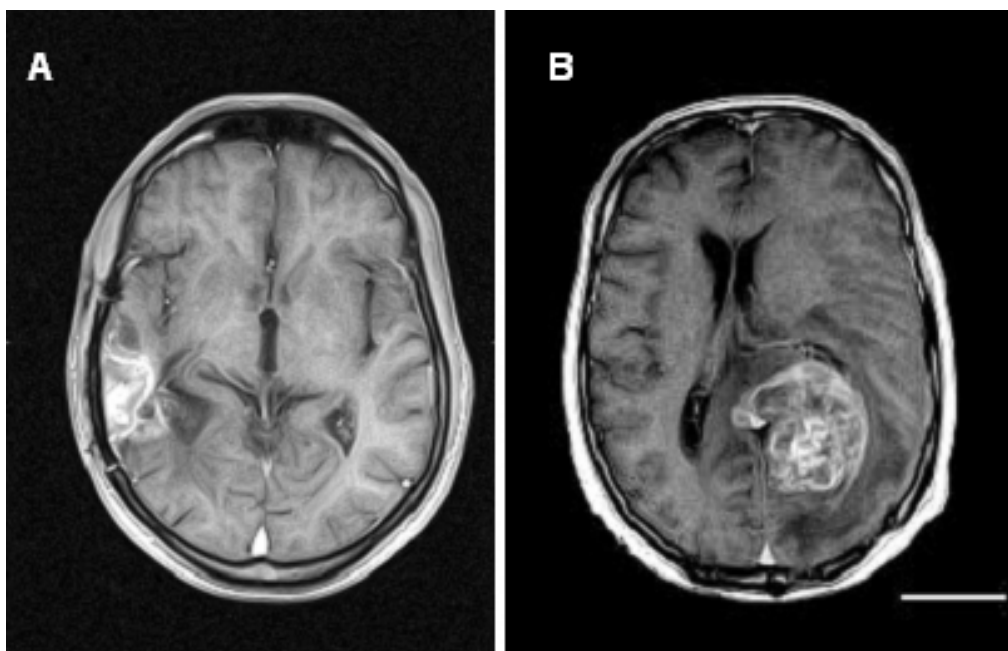
### 4.1 Caracterização da amostra

Os dois cultivos primários de GBM, denominados UGBM1 e UGBM2 foram produzidos a partir de amostras coletadas de dois pacientes do sexo masculino, de 49 e 66 anos, respectivamente (Tabela 2). Nenhum dos pacientes recebeu quimioterapia ou radioterapia anteriormente ao procedimento cirúrgico. O espécime de tumor foi ressecado e utilizado para o isolamento das células. O diagnóstico patológico do tumor foi de GBM levando-se em consideração as características histológicas de proliferação vascular, hiper celularidade, figuras mitóticas, núcleo gemistocístico e necrose.

De acordo com a história clínica (Tabela 2), a sobrevida de ambos os pacientes foi praticamente a mesma, visto que o paciente portador do tumor UGBM1 faleceu um mês antes do paciente portador do tumor UGBM2. No entanto, apesar de terem praticamente a mesma taxa de sobrevida, as dimensões dos tumores, calculadas de acordo com XUE (1999), divergem expressivamente. O tumor UGBM1 apresentava um volume maior (60, 36 mm<sup>3</sup>) que o tumor UGBM2 (41, 63mm<sup>3</sup>). A localização dos tumores também foi distinta. O UGBM1 estava localizado na região temporal e o UGBM2 se encontrava na região occipital (Figura 1). Entretanto, ambos os tumores estavam tipicamente localizados de acordo com a apresentação do GBM (MANSKY & HAMILTON, 2001; SALMAGGI *et al.*, 2005).

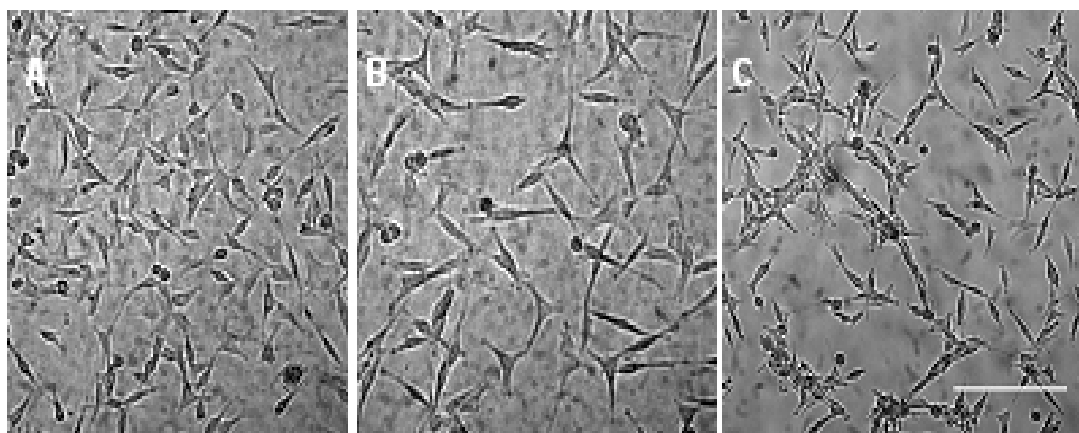
**Tabela 2.** Características clínicas dos pacientes de onde foram obtidas as amostras para os cultivos de UGBM1 e UGBM2.

<b>Pacientes</b>		
	<b>I</b>	<b>II</b>
<b>Cultivo celular</b>	UGBM1	UGBM2
<b>Idade</b>	49 anos	66 anos
<b>Sexo</b>	Masculino	Masculino
<b>Histologia</b>	GBM	GBM
<b>Apresentação clínica</b>	Dor de cabeça	Paralisia do braço direito (transitória)
<b>Performance status</b>	1	1
<b>Localização do tumor</b>	Lobo temporal direito	Lobo occipital esquerdo
<b>Extensão da ressecção</b>	Biópsia	Biópsia
<b>Sobrevida pós-diagnóstico</b>	4 meses	5 meses



**Figura 1.** Imagens obtidas por ressonância magnética dos dois pacientes do estudo. (A) No paciente 1 se observa massa com área hemorrágica na porção temporal direita. As porções laterais e do terceiro ventrículo aparecem dilatadas. (B) O paciente 2 apresenta uma grande massa no lobo occipital esquerdo. Áreas de necrose e edema estão presentes. Barra de escala (5 cm)

De um modo geral, os GBMs podem se apresentar com diferentes aspectos morfológicos, tais como: epitelial, fibroblástico, glial e formas poligonais, conforme destacado pelo American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Na Figura 2 é possível visualizar uma fotografia de um cultivo representativo das células UGBM1 e UGBM2 em monocamadas observadas ao microscópio invertido. A análise *in vitro* revela que os dois tipos celulares apresentam-se com morfologia de célula epitelial. Essencialmente, UGBM1 e UGBM2 têm a mesma morfologia fusiforme com longos processos celulares. Ainda, o aspecto dos cultivos de UGBM1 e UGBM2 é bastante semelhante ao que se verifica no cultivo da linhagem de GBM já estabelecida – U-87MG, utilizada neste trabalho como comparativo para os cultivos primários. A morfologia dos cultivos de UGBM1 e UGBM2 foi observada desde a terceira passagem na cultura e não sofreu alterações até a 120<sup>ª</sup> passagem.



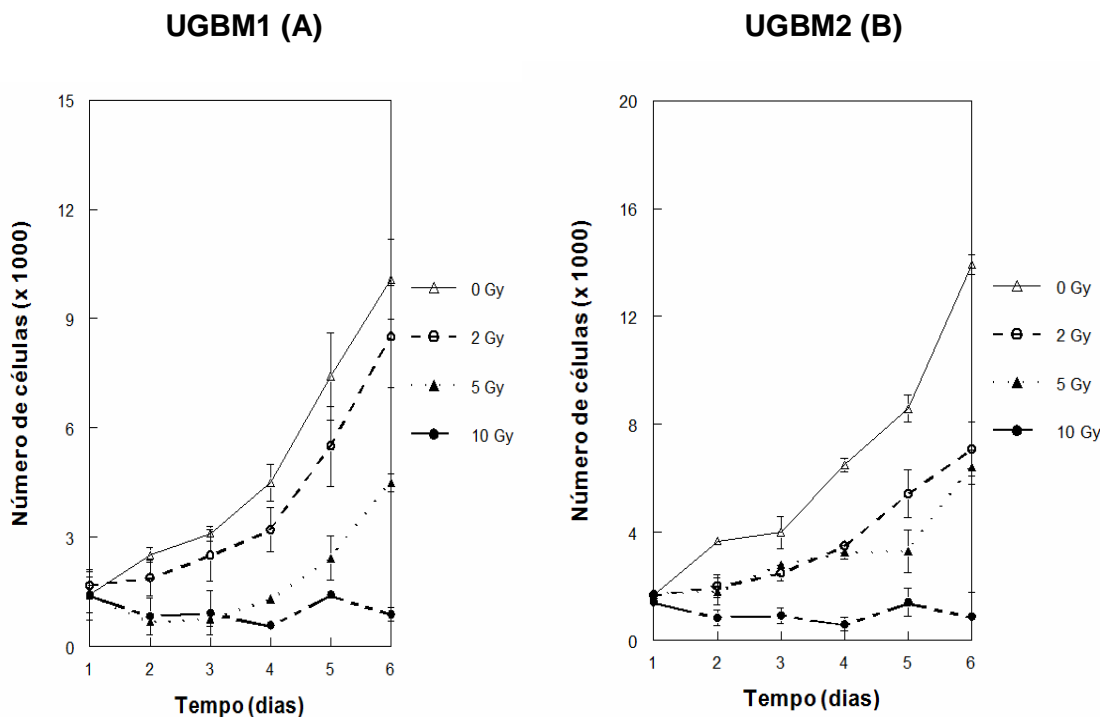
**Figura 2.** Características morfológicas dos cultivos de UGBM1, UGBM2 e U-87MG em monocamada. As análises foram realizadas em microscópio invertido em (A) UGBM1 na passagem 120, (B) UGBM2 na passagem 80 e (C) na linhagem celular U-87MG. Aumento X400. Barra de escala (10  $\mu$ m).

#### 4.2 Efeito da Radiação Ionizante sobre a Proliferação Celular

Posteriormente, os cultivos celulares foram submetidos à radioterapia, tendo como objetivo principal a caracterização do efeito agudo da radiação ionizante sobre a proliferação dos cultivos de UGBM1 e UGBM2. Desta forma, os cultivos foram submetidos a doses de 2, 5 ou 10 Gy de radiação. Imediatamente após o tratamento, foram realizadas curvas de crescimento, onde as células viáveis foram quantificadas a cada 24 h durante 6 dias de cultivo.

Os resultados obtidos nestes experimentos demonstram diferenças de resposta à radiação entre os cultivos estudados (Figura 3). De um modo geral, as células irradiadas sofreram diminuição no seu crescimento, enquanto os controles (não irradiados) mantiveram o seu crescimento exponencial. As células irradiadas sofreram diminuição na proliferação, de acordo com a dose de radiação, embora com diferenças entre os cultivos estudados. Na dose de 2 Gy, o cultivo de UGBM1 não apresentou queda significativa na proliferação celular (Figura 3A). Enquanto a UGBM2 demonstrou queda significativa da proliferação a partir do segundo dia posterior ao tratamento com esta dose ( $p < 0,05$ ) (Figura 3B). Com o tratamento de 5 Gy, ambos os cultivos apresentaram queda significativa na proliferação celular a partir do segundo dia ( $p < 0,05$ ). O efeito mais pronunciado sobre a proliferação celular foi observado na dose de 10 Gy, onde em ambos os cultivos se verifica diminuição significativa no crescimento celular após as primeiras 24 h ( $p < 0,05$ ).





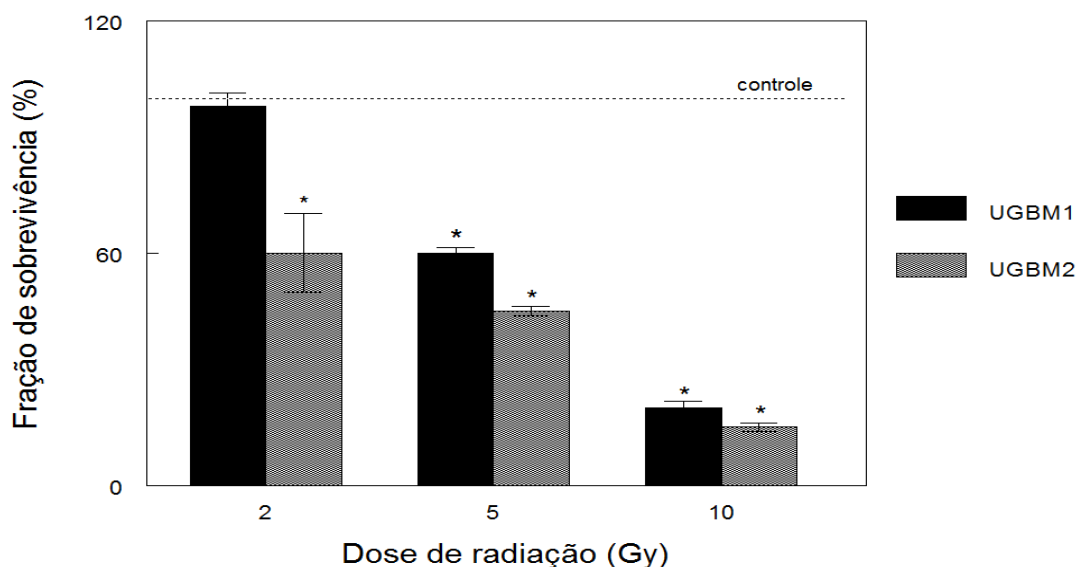
**Figura 3.** Número de células viáveis após irradiação dos cultivos de UGBM1 (A) e UGBM2 (B). Após a irradiação com 2, 5 ou 10 Gy as células viáveis foram quantificadas a cada 24 h durante 6 dias utilizando-se o método de coloração por exclusão *trypan blue*. Os resultados representam valores de média (n=6) e desvio padrão de 3 experimentos independentes. Nos cultivos de UGBM1 e UGBM2 ocorre diferença com significância estatística nos tratamentos com 5 Gy a partir do dia 2 e com 10 Gy a partir do dia 1. Enquanto nos cultivos de UGBM2 já ocorre diferença com significância estatística no tratamento com 2 Gy a partir do dia 2. Em ambos os cultivos as diferenças se mantêm até o dia 6 de cultivo ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3 Efeito da Radiação Ionizante sobre a Formação de Colônias Celulares

Considerando que muitos dos danos celulares desencadeados pela radiação podem ser reparados, a avaliação do efeito da radiação na proliferação num período mais prolongado, é fundamental. Com esta finalidade, o efeito tardio da radiação foi investigado por ensaio clonogênico, 14 dias após irradiação.

Assim, as células foram submetidas à radiação com 2, 5 ou 10 Gy. Posteriormente, as células foram inoculadas em placas de cultivo para a avaliação do efeito da radiação sobre o número de colônias, 14 dias após o tratamento. Nestes experimentos, as frações de sobrevivência foram calculadas a partir da razão do número de colônias formadas no grupo irradiado pelo número de colônias formadas no grupo controle (PETERSEN *et al.*, 1996).

Os resultados destes experimentos estão de acordo com os padrões de comportamento das diferentes linhagens observados como efeito imediato após irradiação. Com 2 Gy de irradiação, a UGBM2 apresentou queda de 40% na fração de sobrevivência ( $p < 0,05$ ). Nesta mesma dose, não se observa diminuição significativa na fração de sobrevivência do cultivo de UGBM1. Com o tratamento de 5 Gy, ambos os cultivos tiveram redução na fração de sobrevivência. O cultivo de UGBM1 apresentou uma diminuição de 40% na fração de sobrevivência, quando comparado ao controle, enquanto na UGBM2 se observa diminuição de 55% ( $p < 0,05$ ). Na dose de 10 Gy a fração de sobrevivência dos cultivos de UGBM1 foi de apenas 20% e, 15% para UGBM2 (Figura 4).



**Figura 4.** Fração de sobrevivência dos cultivos de UGBM1 e UGBM2 irradiados com 2, 5 ou 10 Gy. Após 14 dias foram quantificadas as colônias contendo  $\geq 50$  células. Os valores representam valores de média ( $n=6$ ) e desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes. Os dados são apresentados como fração de sobrevivência obtida a partir da razão do número de colônias irradiadas pelo número de colônias controle, expressa em percentual. Os controles são representados como 100% de fração de sobrevivência. \* Valor considerado significativamente diferente do controle  $p < 0,05$ .

Desta forma, o padrão de sensibilidade à radiação ionizante nos cultivos estudados no efeito tardio foi semelhante ao efeito agudo. O cultivo de UGBM2 se manteve mais radiosensível quando comparado ao cultivo de UGBM1.

Dentre as doses de radiação testadas (2, 5 e 10 Gy), a dose de 5 Gy foi selecionada para os experimentos subseqüentes, considerando que seu efeito de

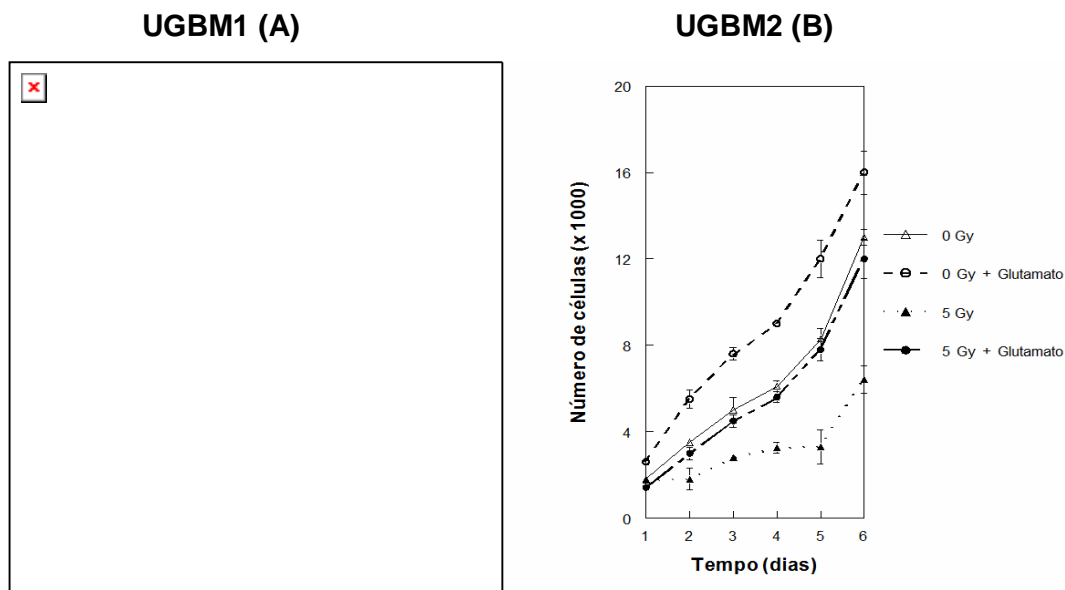
inibição de crescimento agudo (a cada 24 h) e tardio (14 dias) foi intermediário para os cultivos estudados.

#### 4.4 Efeito do Tratamento com Glutamato na Resposta Celular à Radiação Ionizante

Considerando que o aminoácido glutamato tem sido associado a mecanismos de invasão e proliferação dos tumores do SNC e, que a progressão dos gliomas malignos resulta em maior resistência dos GBMs à radioterapia, resolvemos avaliar o efeito do tratamento com glutamato nas resposta celular à radiação ionizante. Assim, quando iniciamos os experimentos para avaliar o efeito do glutamato nos cultivos de UGBM1 e UGBM2 partimos de doses e condições já estabelecidas em outros estudos conduzidos no laboratório (REGNER *et al.*, 2005; SCHUNEMANN *et al.*, 2009). Resumidamente, quando iniciamos este trabalho já sabíamos que doses acima de 20 mM induzem efeito citotóxico na linhagem celular U-87MG, onde identificamos um valor de IC50 de 56 mM. Também verificamos efeito indutor sobre a proliferação celular nas doses de 2 e 5 mM de glutamato na presença de meio sem soro. O tempo de tratamento também ficou estabelecido como sendo de 48h. Desta forma, selecionamos a dose de 5 mM de glutamato para o tratamento por 48h.

##### 4.4.1 Efeito do Tratamento com Glutamato na Proliferação Celular após Radiação Ionizante

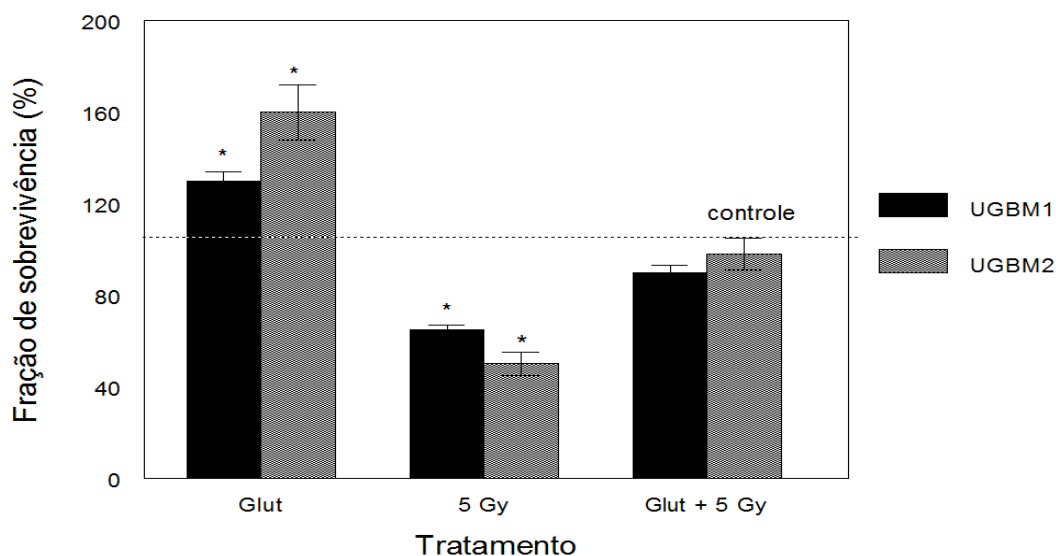
O tratamento com 5 mM de glutamato promoveu aumento na proliferação das células não irradiadas quando comparadas aos controles. No cultivo de UGBM1 este aumento não é significativo, enquanto na UGBM2 se observa aumento significativo a partir do segundo dia ( $p < 0,05$ ). Na dose de 5 Gy de radiação se observa diminuição significativa na proliferação celular em UGBM1 e UGBM2 ( $p < 0,05$ ). No entanto, em ambos os cultivos, o pré-tratamento com glutamato (5 mM) restabeleceu o comportamento da proliferação celular ao mesmo nível dos controles, ainda que submetidas a 5 Gy de irradiação ionizante (Figura 5). Estes resultados sugerem que o glutamato esteja envolvido em mecanismos associados a maior tolerância do GBM aos efeitos da radiação ionizante.



**Figura 5.** Número de células viáveis após irradiação dos cultivos de UGBM1 (A) e UGBM2 (B) pré tratados ou não com glutamato. Os cultivos pré- tratados ou não com glutamato (5 mM) durante 48 horas foram submetidos ou não a irradiação ionizante (5 Gy). Após, as células viáveis foram contadas a cada 24 h durante 6 dias com o método de coloração por exclusão *trypan blue*. Os resultados representam valores de média (n=6) e desvio padrão de 3 experimentos independentes. No cultivo de UGBM2, o tratamento com glutamato promove aumento significativo na proliferação quando comparado ao controle a partir do dia 2. Nos cultivos de UGBM1 e UGBM2, o tratamento com 5 Gy promove diminuição significativa a partir do dia 2. Em todos os casos, as diferenças se mantêm até o dia 6 de cultivo ( $p < 0,05$ ).

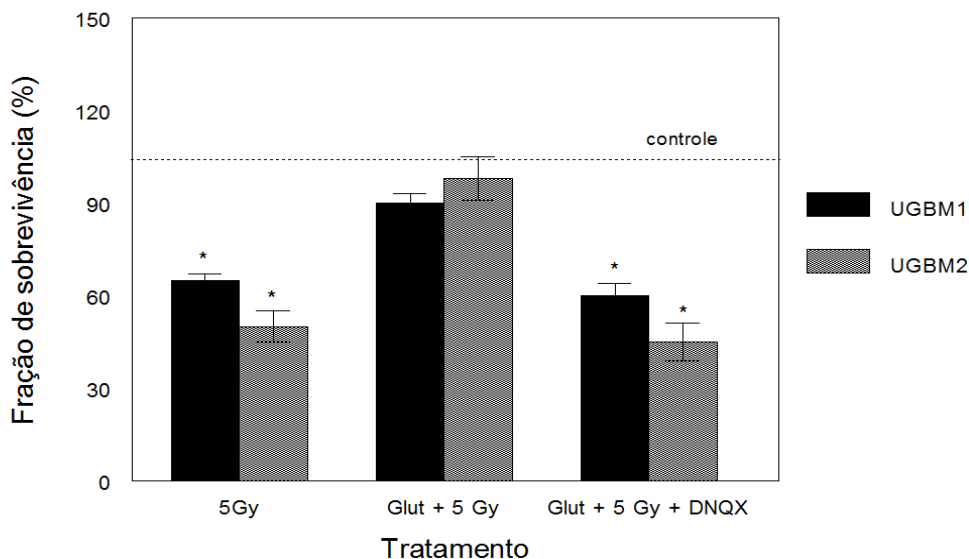
#### 4.4.2 Efeito do Tratamento com Glutamato na Fração de Sobrevivência após Radiação Ionizante

Quando avaliamos o efeito do glutamato sobre a fração de sobrevivência celular, o comportamento celular foi bastante semelhante ao que se observa no efeito agudo do tratamento com glutamato e irradiação (Figura 6). Com 5 Gy de irradiação ambos os cultivos apresentaram queda próxima a 50% na fração de sobrevivência ( $p < 0,05$ ). Enquanto, a adição de glutamato promoveu aumento na fração de sobrevivência de 30% na UGBM1 e 60% na UGBM2 ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma que no efeito imediato, o pré-tratamento com glutamato restaura a fração de sobrevivência ao nível do controle para ambos os cultivos de UGBM1 e UGBM2. Estes resultados sugerem que os efeitos do glutamato sobre a indução de crescimento do GBM desencadeiam mecanismos que persistem e não são apenas transitórios.



**Figura 6.** Fração de sobrevivência dos cultivos UGBM1 e UGBM2 após tratamento com glutamato (5 mM) ou irradiação (5 Gy). Após 14 dias foram quantificadas as colônias contendo  $\geq 50$  células. Os valores representam valores de média ( $n=6$ ) e desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes. Os dados são apresentados como percentuais de fração de sobrevivência obtidos a partir da razão do número de colônias tratadas pelo número de colônias do controle. Os controles são representados como 100% de fração de sobrevivência. \* Valor considerado significativamente diferente do controle  $p < 0,05$ .

No entanto, a adição do antagonista de receptor AMPA – DNQX, restabelece os efeitos da radiação induzidos pela dose de 5 Gy (Figura 7). Estes resultados indicam que o glutamato promove proteção contra a radiação nos cultivos de UGBM1 e UGBM2 através de mecanismos envolvendo ativação dos receptores AMPA.

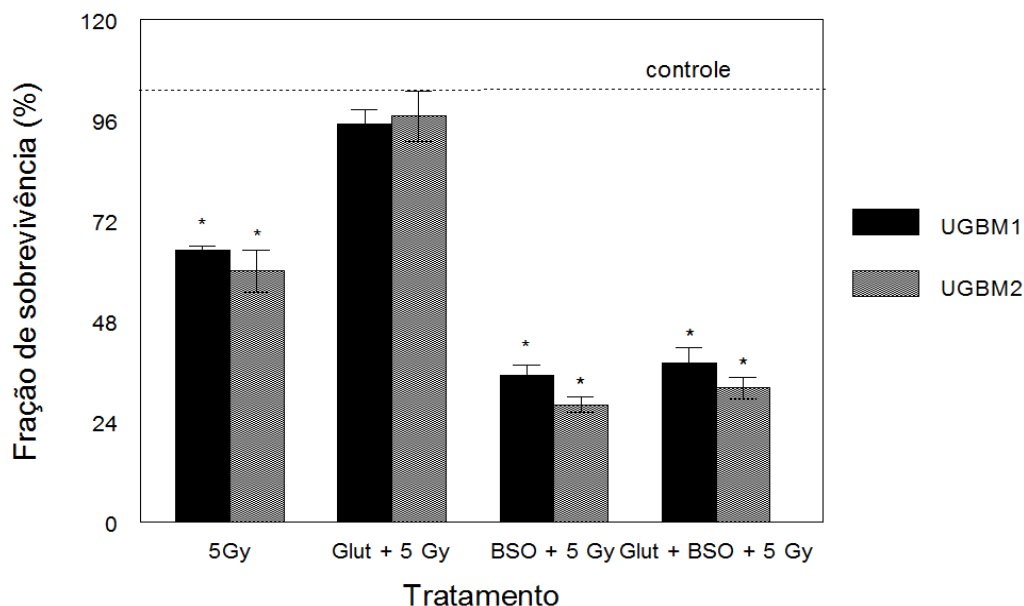


**Figura 7.** Fração de sobrevivência dos cultivos UGBM1 e UGBM2 após tratamento com glutamato (5 mM), irradiação (5 Gy) ou DNQX (500  $\mu$ M). Após 14 dias foram quantificadas as colônias contendo  $\geq 50$  células. Os valores representam valores de média (n=6) e desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes. Os dados são apresentados como percentuais de fração de sobrevivência obtidos a partir da razão do número de colônias tratadas pelo número de colônias do controle. Os controles são representados como 100% de fração de sobrevivência. \*Valor considerado significativamente diferente do controle  $p < 0,05$ .

A liberação de glutamato pelos gliomas ocorre associada ao sistema de captação de cistina via um transportador de aminoácido expresso na membrana plasmática (SATO *et al.*, 1999; YE & SONTHEIMER, 1999) e a cistina é um aminoácido precursor na síntese do agente redutor GSH. Assim, o aumento no conteúdo de GSH pode representar o mecanismo pelo qual o glutamato está protegendo as células de GBM contra os efeitos da radiação ionizante. Desta forma, resolvemos avaliar se a resposta celular induzida após tratamento com glutamato e radiação ionizante tem a participação da GSH. Para isto, as células foram pré-tratadas com o inibidor de GSH – BSO - utilizando-se uma dose estabelecida em estudos do nosso laboratório.

Ao analisamos o efeito do glutamato e BSO (25  $\mu$ M) na fração de sobrevivência de UGBM1 e UGBM2 após irradiação observamos que o pré-tratamento com o inibidor de GSH promove diminuição significativa na fração de sobrevivência em ambos os cultivos celulares ( $p < 0,05$ ), demonstrando seu efeito radiosensibilizante. Quando o pré-tratamento com BSO foi combinado ao tratamento com glutamato, verificamos que o efeito de proteção do glutamato sobre o

crescimento celular desaparece nos cultivos de UGBM1 e UGBM2 ( $p < 0,05$ ) (Figura 8). Assim, os resultados sugerem que a ação protetora sobre as respostas de UGBM1 e UGBM2 promovida pelo glutamato envolva o sistema de captação da cistina, culminando na produção de GSH. Com aumento de GSH, as células em melhores condições de neutralizarem as espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas pela ação radiação ionizante.



**Figura 8.** Fração de sobrevivência dos cultivos UGBM1 e UGBM2 após tratamento com glutamato (5 mM), irradiação (5 Gy) ou BSO (25  $\mu$ M). Após 14 dias foram quantificadas as colônias contendo  $\geq 50$  células. Os valores representam valores de média ( $n=6$ ) e desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes. Os dados são apresentados como percentuais de fração de sobrevivência obtidos a partir da razão do número de colônias tratadas pelo número de colônias do controle. Os controles são representados como 100% de fração de sobrevivência. \* Valor considerado significativamente diferente do controle  $p < 0,05$ .

## 5. Discussão

Os gliomas correspondem a mais da metade de todas as neoplasias primárias que atingem o SNC. Estes tumores estão entre as principais causas de morte por câncer na infância, são a terceira causa de morte entre as patologias que acometem o SNC e sua prevalência tem aumentado consideravelmente na terceira idade (FISHER *et al.*, 2007; BRANDES, 2008). O tratamento dos gliomas de alto grau pode envolver diversas abordagens terapêuticas. A cirurgia é a primeira linha, mas apresenta limitações dada a grande capacidade de infiltração destes tumores, o que deixa a ressecção completa praticamente impossível (BRANDES, 2008). A radioterapia, após o procedimento cirúrgico, é o principal tratamento para estes tumores, no entanto sua eficácia é limitada em função da radioresistência intrínseca dos GBMs (VAN DEN BENT *et al.*, 2005; BRANDES, 2008). Assim, a média de sobrevivência dos pacientes com GBM é extremamente curta, ficando em torno de 10 meses, e apenas 3% dos pacientes sobrevivem mais de 5 anos após ressecção cirúrgica e tratamento com radiação ionizante (BRANDES, 2008).

Em virtude das limitações éticas aos estudos com humanos, a utilização de cultivos celulares derivados de GBMs humanos tem sido muito comum como modelo *in situ* das neoplasias gliais (JOHNSON *et al.*, 2001; VOSKOGLOU-NOMIKOS *et al.*, 2003). Ainda que as linhagens derivadas de gliomas humanos representem uma excelente alternativa para a investigação de mecanismos celulares, no nosso estudo utilizamos cultivos celulares derivados de fragmentos teciduais de pacientes portadores de GBMs sem história prévia de outras neoplasias cerebrais. Os cultivos primários são considerados um modelo experimental com maior proximidade do tecido original quando comparados ao modelo de linhagens (SHARMA *et al.*, 2003; KUNZ-SCHUGHART *et al.*, 2004; KNIGHT *et al.*, 2005).

É amplamente aceito que o sucesso da radioterapia na resposta ao tratamento dos pacientes é limitado pela radioresistência dos GBMs. A radioresistência dos GBMs já foi demonstrada pela recorrência local do volume irradiado (SNEED *et al.*, 1994). Assim, o entendimento das respostas moleculares das células de GBM é crucial para a identificação de estratégias terapêuticas mais eficazes. No presente estudo, avaliamos o envolvimento do glutamato na radiosensibilidade de dois cultivos primários de GBM (UGBM1 e UGBM2).



Primeiramente, verificamos que, em resposta ao tratamento radioterápico ambos os cultivos - UGBM1 e UGBM2 - apresentaram inibição dose-dependente na proliferação celular tanto no período imediato (proliferação celular) quanto no tardio (formação de colônias) após irradiação ionizante. Entretanto, observamos uma clara diferença na sua radiosensibilidade, o que se mostrou de acordo com a heterogeneidade clínica tipicamente observada nos GBMs (HOMMA *et al.*, 2006).

Os tumores cerebrais são submetidos a uma característica exclusiva entre as demais neoplasias, que é a restrição ao seu crescimento pelo arcabouço ósseo constituído pelos ossos do crânio ou coluna. Neste sentido, as investigações apontam o glutamato como elemento essencial ao crescimento e progressão dos GBMs. Tem sido sugerido que os gliomas de alto grau crescem na margem externa do tumor, liberando o neurotransmissor glutamato diretamente no tecido cerebral adjacente em concentrações que são suficientes para causar a morte de neurônios e de algumas células da glia, criando assim, mais espaço para o crescimento dos gliomas (BEHRENS, *et al.*, 2000; CHUNG *et al.*, 2005; SONTHEIMER, 2008; LYONS *et al.*, 2007). Atualmente, sabe-se que a capacidade de liberação de glutamato é diretamente proporcional ao crescimento tumoral *in vivo*, independente da taxa de proliferação e da atividade mitótica das células investigadas (SONTHEIMER, 2008; LYONS *et al.*, 2007). Há duas possíveis hipóteses para estes achados: (1) o glutamato liberado pela célula tumoral facilita a expansão do tumor ao provocar a degeneração do tecido neural adjacente e a liberação de substâncias pró-inflamatórias que podem favorecer o crescimento tumoral; (2) o glutamato pode estar agindo diretamente sobre as células tumorais como um fator trófico.

Quando avaliamos a citotoxicidade do glutamato nos cultivos de UGBM1 e UGBM2 (dados não mostrados neste trabalho), verificamos em estudos piloto do nosso laboratório que ambos os cultivos celulares demonstraram resistência relativa aos efeitos do glutamato. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios conduzidos por nosso grupo (REGNER *et al.*, 2005, SCHUNEMANN *et al.*, 2009) e também com investigações de outros grupos de pesquisa (CAMPBELL *et al.*, 1985; YE *et al.*, 1999; TAKANO *et al.*, 2001). Comparativamente, a resistência aos efeitos citotóxicos do glutamato em GBMs foi pelo menos 45 vezes maiores que as concentrações tóxicas nos tecidos gliais normais (CHEN *et al.*, 2000; MATUTE *et al.*, 2002). O tratamento com 5 mM de glutamato promoveu aumento na proliferação das células. No cultivo de UGBM1 este aumento não é significativo, enquanto na

UGBM2 se observa aumento significativo, indicando mais uma vez, a heterogeneidade típica dos GBMs (HOMMA *et al.*, 2006). No entanto, quando o glutamato foi adicionado em associação com a irradiação ionizante, as diferenças entre os cultivos não puderam ser observadas. Em ambos os cultivos, o tratamento com 5 mM de glutamato tornou as células mais tolerantes aos efeitos da radiação ionizante e o crescimento se manteve nos níveis do controle.

Diferentemente dos neurônios, que expressam receptores NMDA, as células do GBM expressam uma subclasse de receptores AMPA que são permeáveis ao cálcio quando possuem as subunidades no receptor GluR1, GluR4 e GluR2Q, mas impermeáveis ao cálcio na subunidade GluR2 (SONTHEIMER, 2003). A adição do DNQX, antagonista dos receptores AMPA nos cultivos de UGBM1 e UGBM2 desfaz o efeito estimulatório sobre o crescimento verificado por aumento na fração de sobrevivência quando é realizado tratamento com 5 mM de glutamato, indicando o envolvimento dos receptores AMPA nas respostas mediadas pelo glutamato após a radiação ionizante. Neste sentido, diferentes estudos identificaram papel relevante dos receptores AMPA na progressão, crescimento e invasão dos gliomas malignos (VAN VUURDEN *et al.*, 2009; VANHOUTTE & HERMANS, 2008). Estes achados terminaram encorajando e justificando a condução de estudos clínicos em gliomas malignos com o inibidor de receptor AMPA – talampanel. Os resultados, muito recentes, do protocolo de fase II encorajam a continuidade das investigações, tendo em vista que o agente tem excelente penetrância no SNC e boa tolerabilidade (IWAMOTO *et al.*, 2010).

A habilidade da radioterapia de induzir dano ao DNA e apoptose está bem documentada em vários tipos de células (BERNHARD, 1999; LOWE, 2000; WATTERS, 1999). Contudo, a análise dos efeitos a curto prazo da radiação em gliomas de alto grau não identificaram a rápida indução de apoptose encontrada em outras células (BOGLER, 2002; YAO *et al.*, 2003). De fato, mecanismos antiapoptóticos foram relacionados com a radioresistência intrínseca das células de GBM (BOGLER, 2002). Mutações oncogênicas bem caracterizadas detectadas em um número significativo de gliomas malignos de alto grau incluem: superexpressão ou amplificação de genes envolvidos com fatores de crescimento e/ou seus receptores, perda de função de genes *TP53* e/ou *Rb* de checagem no ponto G1 do ciclo celular, ou ainda a superexpressão de p53. Frequentemente a superexpressão do gene *mdm-2*, alterações em genes antiapoptóticos com o bcl-2 e deleções em

genes que codificam para certos inibidores de quinases ciclina-dependente também são observadas em gliomas (BEHIN, 2003; KANU *et al.*, 2009). Portanto, o aumento da resposta apoptótica seguida da radiação em células malignas de gliomas tem sido foco de estudo na neuro-oncologia. Nos experimentos deste trabalho não avaliamos a apoptose e seus marcadores, no entanto, observamos que a adição de glutamato tornou os cultivos mais tolerantes à radiação ionizante garantindo a continuidade da proliferação celular logo imediatamente após a radioterapia. Neste caso, é possível sugerir que estão sendo desencadeadas vias antiapoptose nas células tratadas com glutamato. Os mecanismos envolvidos nesta resposta não foram investigados neste estudo, abrindo-se aqui uma perspectiva de investigação para estudos futuros.

A liberação de glutamato pelos gliomas ocorre como uma consequência da captação do aminoácido cistina via sistema Xc expresso na membrana plasmática. Através deste sistema a célula importa cistina na troca por glutamato (YE & SONTHEIMER, 1999; SATO *et al.*, 1999). No interior da célula, a cistina é utilizada como precursor na síntese do agente redutor GSH. A inibição farmacológica do sistema Xc inibe a produção de GSH e diminui expressivamente o crescimento dos tumores cerebrais *in vivo* (CHUNG *et al.*, 2005). Além disso, o conteúdo de GSH e seus sistemas, tem sido relacionado ao padrão de comportamento dos gliomas em resposta a tratamentos que induzem estresse oxidativo (ZENGIN *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2006). A radiação ionizante promove danos celulares através da geração de espécies reativas de oxigênio. Assim utilizando-se de sistemas antioxidantes, os gliomas se protegem dos potenciais danos (ZHONG *et al.*, 1999; MARTÍN *et al.*, 2007). Desta forma, o aumento no conteúdo de GSH pode representar um mecanismo pelo qual o glutamato está protegendo as células de GBM contra os efeitos da radiação ionizante. Ao analisamos o efeito do BSO na fração de sobrevivência de UGBM1 e UGBM2 após irradiação, observamos que o pré-tratamento com o inibidor de GSH promove diminuição significativa na fração de sobrevivência em ambos os cultivos celulares, demonstrando efeito radiosensibilizante. Quando o pré-tratamento com BSO foi combinado ao tratamento com glutamato, verificamos maior efeito da radiação ionizante na inibição de crescimento em UGBM1 e UGBM2. Assim, os resultados sugerem que a ação protetora sobre as respostas de UGBM1 e UGBM2 promovida pelo glutamato envolva o sistema de captação da cistina, culminando na produção de GSH.

Além disso, a terapia com radiação pode aumentar a ativação de rotas intracelulares de rEGF após o tratamento, o que pode contribuir contra a morte celular induzida por radiação ionizante. A estimulação de rEGF pelo fator de crescimento pode levar a uma ativação do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que catalisa a conversão do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Por fim, os PIP3 associados à membrana ligam-se e ativam a proteína quinase serina-treonina Akt (CANTLEY & NEEL, 1999). Embora, neste trabalho, não tenhamos investigado a participação da via do rEGF na resposta a radiação ionizante, poderemos esperar o seu envolvimento, ainda que parcial, na resistência à radioterapia dos GBM induzida pelo glutamato, pois estivemos empregando as mesmas condições de tratamento empregadas em outro estudo do laboratório, onde encontramos que o glutamato promove aumento na via de sinalização do rEGF em GBMs (SCHUNEMANN *et al.*, 2009).

Ainda que os cultivos celulares proporcionem um bom modelo do comportamento e da biologia dos tumores, não refletem a realidade *in vivo*. Afinal, não podem ser desconsideradas as diferenças no que diz respeito a: disponibilidade de nutrientes, importância do espaço extracelular e presença de células neurais viáveis. Em situações *in vivo*, os GBMs possuem uma maior disponibilidade de precursores para a síntese de glutamato, o que associado a morte citotóxica das células neuronais adjacentes a massa tumoral pode elevar constantemente as concentrações de glutamato (ROSLIN *et al.*, 2003). Ainda, o espaço extracelular *in vivo* é aproximadamente dez mil vezes menor que o espaço extracelular do cultivo em monocamada. No entanto, as informações sobre mecanismos e comportamento celular identificados nos cultivos celulares são etapas necessárias e fundamentais para se avaliar a possibilidade de estabelecer protocolos *in vivo* ou até mesmo clínicos para a investigação terapêutica (DJEDID *et al.*, 2009; KANU *et al.*, 2009).

Em suma, os resultados do nosso estudo demonstram que o glutamato, além de promover crescimento dos GBMs deve estar envolvido em mecanismos de resistência à radioterapia via receptores AMPA e utilizando-se do sistema GSH. Ainda que os achados deste estudo não possam nos levar a uma explicação relativa ao mecanismo que correlaciona estes fenômenos, é possível sugerir que o papel protetor do glutamato na resposta celular ao estresse oxidativo, induzido pela radiação ionizante, seja mais amplamente investigado para que se possa avaliar estratégias de radiosensibilização dos GBMs.

## 6. Conclusões

- O tratamento com radiação ionizante provoca diminuição no crescimento dos cultivos de UGBM1 e UGBM2.
- Os cultivos de UGBM1 e UGBM2 apresentam sensibilidades diferentes à radiação ionizante tanto na sua resposta imediata quanto na tardia. Na dose de 2 Gy, o cultivo de UGBM2 sofre inibição significativa na proliferação e fração de sobrevivência enquanto na UGBM1 não se observa efeito.
- Nas doses de 5 Gy e 10 Gy de irradiação, ambos os cultivos sofreram diminuição significativa de crescimento imediata ou mais tardiamente após os tratamentos.
- O tratamento com glutamato (5 mM) promoveu aumento significativo na proliferação de UGBM2, o que não se observou no cultivo de UGBM1.
- O pré-tratamento com glutamato (5 mM) restabeleceu o comportamento da proliferação celular dos cultivos de UGBM1 e UGBM2 ao mesmo nível dos controles, ainda que submetidas a 5 Gy de irradiação ionizante.
- A adição do antagonista do receptor AMPA – DNQX restabeleceu os efeitos inibitórios da radiação ionizante (5 Gy) em ambos os cultivos celulares, indicando que os efeitos protetores do glutamato na resposta à radioterapia nos GBMs são mediados pelos receptores de AMPA.
- O inibidor de GSH – BSO - promoveu diminuição significativa na fração de sobrevivência tanto como tratamento único como quando combinado ao glutamato (5 mM), sugerindo que a ação protetora sobre as respostas do glutamato à radioterapia em UGBM1 e UGBM2 envolve o sistema GSH.

## 7. Referências Bibliográficas

- ANDERSON, C.M., SWANSON, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, v.32, p.1-14, 2000.
- ARCELLA, A., CARPINELLI, G., BATTAGLIA, G., D'ONOFRIO, M., SANTORO, F., NGOMBA, R.T., BRUNO, V., CASOLINI, P., GIANGASPERO, F., NICOLETTI, F. Pharmacological blockade of group II metabotropic glutamate receptors reduces the growth of glioma cells in vivo. *Neuro-oncology*, v.7, p.236-245, 2005.
- ARONICA, E., GORTER, J.A., IJLST-KEIZERS, H., ROZEMULLER, A.J., YANKAYA, B., LEENSTRA, S., TROOST, D. Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *The European Journal of Neuroscience*, v.17, p.2106-2118, 2003.
- BEHIN, A., HOANG-XUAN, K., CARPENTIER, A.F., DELATTRE, J.Y. Primary brain tumors in adults. Federation de Neurologie Mazarin. *Lancet*, v.361, p.323-331, 2003.
- BENDER, A.S., REICHELT, W., NOREMBERG, M.D. Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochemistry International*, v.37, p.269-276, 2000.
- BERNHARD, E.J., MCKENNA, W.G., MUSCHEL, R.J. Radiosensitivity and the cell cycle. *The Cancer Journal From Scientific American*, v.5, p. 194-204, 1999.
- BOGLER, O., WELLER, M. Apoptosis in gliomas, and its role in their current and future treatment. *Frontiers in Bioscience*, v.7, p.339-353, 2002.
- BRANDES, A. State-of-the-art treatment of high-grade brain tumors. *Seminars in Oncology*, v.30, p.4-9, 2003.
- BRANDES, A.A. *et. al.* Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v.67, p.139-152, 2008.
- CAMPBELL, G.L., BARTEL, R., FREIDMAN, H.S., BIGNER, D.D. Effect of glutamate analogues on brain tumor cell lines. *Journal of Neurochemistry*, v.45, p.1186-1192, 1985.
- CANTLEY, L.C., NEEL, B.G. New insights into tumor suppression: PTEN suppress tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.96, p.4240-4245, 1999.
- CARTMELL, J., SCHOEPP, D.D. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *Journal of Neurochemistry*, v.75, p.889-907, 2000.
- CHANG, J. E., KHUNTIA, D., ROBINS, H.I., MEHTA, M.P. Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. v.5, p.894-902, 907-915, 2007.

CHEN, C.J., LIAO, S.L., KUO, J.S. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, v.75, p.1557-1565, 2000.

CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, v.1, p.623-634, 1988.

CHRISTENSEN, H.C., KOSTELJANETZ, M., JOHANSEN, C. Incidences of gliomas and meningiomas in Denmark, 1943 to 1997. *Neurosurgery*, v.52, p.1327-1334, 2003.

CHUNG, W.J., LYONS, S.A., NELSON, G.M., HAMZA, H., GLADSON, C.L., GILLESPIE, G.Y., SONTHEIMER, H. Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *The Journal of Neuroscience*, v.25, p.7101-7110, 2005.

CLAES, A., IDEMA, A.J., WESSELING, P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathologica*, v.114, p. 443-458, 2007.

COHN, M.A., D'ANDREA, A.D. Chromatin recruitment of DNA repair proteins: lessons from the fanconi anemia and double-strand break repair pathways. *Molecular Cell*, v.32, p. 306-312, 2008.

COLLINS, V.P. Brain tumours: classification and genes. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v.75, Suppl 2, p. ii2-11, 2004.

D'ONOFRIO, M., ARCELLA, A., BRUNO, V., NGOMBA, R.T., BATTAGLIA, G., LOMBARI, V., RAGONA, G., CALOGERO, A., NICOLETTI, F. Pharmacological blockade of mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors reduces cell proliferation in cultured human glioma cells. *Journal of Neurochemistry*, v.84, p.1288-1295, 2003.

DEANGELIS, L.M. Brain Tumors. *The New England Journal of Medicine*, v.344, p.114-123, 2001.

DINGLEDINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., TRAYNELIS, S.F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, v. 51, p. 7-61, 1999.

DJEDID, R., TOMASI, O., HAIDARA, A., RYNKOWSKI, M., LEFRANC, F. Glioblastoma treatment in 2010. *Revue Médicale de Bruxelles*, v.30, p.496-505, 2009.

DORAN, S.E., THORELL, W.E. Brain tumors: population-based epidemiology, environment risk factors, and genetic and hereditary syndromes. In: WINN, H. R. (Ed). *Youmans Neurological Surgery*. Philadelphia: Saunders, v.5, p.807-815, 2003.

DZIEDZIC, B., PREVOT, V., LOMNICZI, A., JUNG, H., CORNEA, A., OJEDA, S.R. Neuron-to-glia signaling mediated by excitatory amino acid receptors regulates ErbB receptor function in astroglial cells of the neuroendocrine brain. *The Journal of Neuroscience*, v.23, p.915-926, 2003.

FARR-JONES, M.A., PARNEY, I.F., PETRUK, K.C. Improved technique for establishing short term human brain tumor cultures. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 43, p. 1-10, 1999.

FIKE, J.R., ROLA, R., LIMOLI, C.L. Radiation response of neural precursor cells. *Neurosurgery Clinics of North America*, v.18, p.115-127, 2007.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, v.42, p.1-11, 1984.

FISHER, J.L., SCHWARTZBAUM, J.A., WRENSCH, M., WIEMELS, J.L. Epidemiology of brain tumors. *Neurologic Clinics*. v.25, p.867-890, 2007.

FRANCO-HERNANDEZ, C., MARTÍNEZ-GLEZ, V., REY, J. A. Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugía*, v. 18, p. 373-382, 2007.

FURNARI, F.B., FENTON, T., BACHOO, R.M., MUKASA, A., STOMMEL, J.M., STEGH, A., HAHN, W.C., LIGON, K.L., LOUIS, D.N., BRENNAN, C., CHIN, L., DEPINHO, R.A., CAVENEE, W.K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, v.21, p.2683-2710, 2007.

GARCION, E., LAMPRECHT, A., HEURTAULT, B., PAILLARD, A., AUBERT-POUESSEL, A., DENIZOT, B., MENEI, P., BENOIT, J.P. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 5, p. 1710–1722, 2006.

GEGELASHVILI, G., DEHNES, Y., DANBOLT, N.C., SCHOUSBOE, A. The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signaling mechanisms. *Neurochemistry International*, v.37, p.163-170, 2000.

GLOECKLER, R.L., REICHAMAN, M.E., LEWIS, D.R., HANKEY, B.F., EDWARDS, B.K. Cancer survival incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Oncologist*, v.8, p.541-552, 2003.

GOLDING, S.E., MORGAN, R.N., ADAMS, B.R., HAWKINS, A.J., POVIRK, L.F., VALERIE, K. Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells. *Cancer Biology & Therapy*, v.8, p.730-738, 2009.

HEIMBERGER, A.B., SUKI, D., YANG, D., SHI, W., ALDAPE, K. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *Journal of Translational Medicine*, v.3, p.38, 2005.

HOMMA, T., FUKUSHIMA, T., VACCARELLA, S., YONEKAWA, Y., DI PATRE, P.L., FRANCESCHI, S., OHGAKI, H. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v.65, p.846-854, 2006.



HUSSAINI, I.M., CARPENTER, J.E., REDPATH, G.T., SANDO, J.J., SHAFFREY, M.E., VANDENBERG, S.R. Protein kinase C- $\eta$  regulates resistance to UV- and gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma cells by preventing caspase-9 activation. *Neuro-Oncology*, v.4, p.9-21, 2002.

ISHIUCHI, S., YOSHIDA, Y., SUGAWARA, K., AIHARA, M., OHTANI, T., WATANABE, T., SAITO, N., TSUZUKI, K., OKADO, H., MIWA, A., NAKAZATO, Y., OZAWA, S. Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation. *The Journal of Neuroscience*, v.27, p.7987-8001, 2007.

ISHIUCHI, S., TSUZUKI, K., YOSHIDA, Y., YAMADA, N., HAGIMURA, N., OKADO, H., MIWA, A., KURIHARA, H., NAKAZATO, Y., TAMURA, M., SASAKI, T., OZAWA, S. Blockage of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nature Medicine*, v.8, p.971-978, 2002.

IWAMOTO, F.M., KREISL, T.N., KIM, L., DUIC, J.P., BUTMAN, J.A., ALBERT, P.S., FINE, H.A. Phase 2 trial of talampanel, a glutamate receptor inhibitor, for adults with recurrent malignant gliomas. *Cancer*, 2010.

JOHNSON, J.I., DECKER, S., ZAHAREVITZ, D., RUBINSTEIN, L.V., VENDITTI, J.M., SCHEPARTZ, S., KALYANDRUG, S., CHRISTIAN, M., ARBUCK, S., HOLLINGSHEAD, M., SAUSVILLE, E.A. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British Journal of Cancer*, v. 84, p.1424-1431, 2001.

JOKI, T., CARROLL, R.S., DUNN, I.F., ZHANG, J., ABE, T., BLACK, P.M. Assessment of alterations in gene expression in recurrent malignant glioma after radiotherapy using complementary deoxyribonucleic acid microarrays. *Neurosurgery*, v. 48, p.195-202, 2001.

KANU, O.O., HUGHES, B., DI, C., LIN, N., FU, J., BIGNER, D.D., YAN, H., ADAMSON, C. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clinical Medicine. Oncology*, v.3, p.39-52, 2009.

KANZAWA, T., GERMANO, I. M., KOMATA, T., ITO, H., KONDO, Y., KONDO, S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation*, v.11, p.448-457, 2004.

KLEIHUES, P., BURGER, P.C., SCHEITHAUER, B.W. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathology*, v.3, p.255-268, 1993.

KNIGHT, L.A., CONROY, M., FERNANDO, A., POLAK, M., KURBACHER, C.M., CREE, I.A. Pilot studies of the effect of zoledronic acid (Zometa) on tumor-derived cells ex vivo in the ATP- based tumor chemosensitivity assay. *Anticancer Drugs*, v. 16, p.969-976, 2005.

KUNZ-SCHUGHART, L.A., FREYER, J.P., HOFSTAEDTER, F., EBNER, R. The use of 3- D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *Journal of Biomolecular Screening*, v.9, p.273-285, 2004.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

LEVIN, A. V. *et al.* Phase III Randomized Study of Postradiotherapy Chemotherapy with DMFO-PVC versus PVC for Glioblastoma Multiforme. *Clinical Cancer Research*, v. 6, p. 3878-3884, 2000.

LI, Y., COPIN, J.C., REOLA, L.F., CALAGUI, B., GOBBEL, G.T., CHEN, S.F., SATO, S., EPSTEIN, C.J., CHAN, P.H. Reduced mitochondrial manganese-superoxide dismutase activity exacerbates glutamate toxicity in cultured mouse cortical neurons. *Brain Research*, v.814, p.164-170, 1998.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, v.79, p.1431-1568, 1999.

LIPTON, S.A., ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England Journal of Medicine*, v.330, p.613-622, 1994. Review.

LOUIS, D.N., OHGAKI, H., WIESTLER, O.D., CAVENEE, W.K., BURGER, P.C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B.W., KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, v.114, p.97-109, 2007.

LOWE, S.W., LIN, A.W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, v.21, p.485-495, 2000.

LYONS, S.A., CHUNG, W.J., WEAVER, A.K., OGUNRINU, T., SONTHEIMER, H. Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Research*, v.67, p.9463-9471, 2007.

MANSKY, P.J., HAMILTON, J.M. In Central Nervous System Tumors. *Bethesda Handbook of Clinical Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, p.397-416, 2001.

MARTÍN, V., HERRERA, F., GARCÍA-SANTOS, G., ANTOLÍN, I., RODRIGUEZ-BLANCO, J., RODRIGUEZ, C. Signaling pathways involved in antioxidant control of glioma cell proliferation. *Free Radical Biology & Medicine*, v.42, p.1715-1722, 2007.

MASON, W. P., CAIRNCROSS, J. G. Drug Insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma — impact of a recent trial. *Nature Clinical Practice. Neurology*, v.1, p.88-95, 2005.

MATUTE, C., ALBERDI, E., IBARRETXE, G., SANCHEZ-GOMEZ, M.V. Excitotoxicity in glial cells. *European Journal of Pharmacology*, v.447, p. 239-246, 2002.

MCMILLAN, T.J., LEATHERMAN, E., RIDLEY, A., SHORROCKS, J., TOBI, S.E., WHITESIDE, J.R. Cellular effects of long wavelength UV light (UVA) in mammalian cells. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.60, p. 969-976, 2008.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*, v.130, p.1007S-1015S, 2000.

MICHAJLOWSKY, C., NIURA, F.K., DO VALLE, A.C., SONOHARA, S., MENEGUIN, T.D., TSANACLIS, A.M. Experimental tumors of the central nervous system: standardisation of a model in rats using the 9L glioma cells. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v.61, p.234-240, 2003.

MILLER, R.C., PERRY, A., Glioblastoma: Morphologic and Molecular Genetic Diversity. *GBM Variants*, v.131, p.397-406, 2007.

MISRA, A., GANESH, S., SHAHIWALA, A., SHAH, S.P. Drug delivery to the central nervous system: a review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v.6, p. 252- 273, 2003.

MUKHERJEE, B., MCELLIN, B., CAMACHO, C.V., TOMIMATSU, N., SIRASANAGANDALA, S., NANNEPAGA, S., HATANPAA, K.J., MICKEY, B., MADDEN, C., MAHER, E., BOOTHMAN, D.A., FURNARI, F., CAVENEE, W.K., BACHOO, R.M., BURMA, S. EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Research*, v.69, p.4252-4259, 2009.

NODA, S.E., EL-JAWAHRI, A., PATEL, D., LAUTENSCHLAEGER, T., SIEDOW, M., CHAKRAVARTI, A. Molecular advances of brain tumors in radiation oncology. *Seminars in Radiation Oncology*, v.19, p.171-178, 2009.

O'BRIEN, M.L., TEW, K.D. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *European Journal of Cancer*, v.32, p.967-978, 1996.

PETERSEN, C., PETERSEN, S., MILAS, L., LANG, F.F., TOFILON, P.J., Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clinical Cancer Research*, v.6, p.2513-2520, 2000.

RAO, J.S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature Reviews. Cancer*, v.3, p.489-501, 2003.

REARDON, D.A., WEN, P.Y., Therapeutic Advances in the Treatment of Glioblastoma: Rationale and Potential Role of Targeted Agents. *The Oncologist Neuro-Oncology*, v.11, p.152-164, 2006.

REGNER, A., SCHUNEMANN, D.P., GRIVICICH, I., *et al.* Effects of toxic doses of glutamate on Cu-Zn and Mn/superoxide dismutases activities in human glioma cell lines. *Journal of Neuro-oncology*, v.71, p.9-17, 2005.

RLI, H.F., KIM, J.S., WALDMAN, T. Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiation Oncology*, v.4, p.43, 2009.

ROA, W., BRASHER, P.M., BAUMAN, G., ANTHES, M., BRUERA, E., CHAN, A., FISHER, B., FULTON, D., GULAVITA, S., HAO, C., HUSAIN, S., MURTHA, A., PETRUK, K., STEWART, D., TAI, P., URTASUN, R., CAIRNCROSS, J.G., FORSYTH, P. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *Journal of Clinical Oncology*, v.22, p.1540-1541, 2004.

ROCHA, A. B., REGNER, A., GRIVICICH, I., SCHUNEMANN, D. P., DIEL, C., KOVALESKI, G., FARIAS, C. F., MONDADORI, E., ALMEIDA, L., BRAGA FILHO, H., SCHWARTSMANN, G. Radioresistance is associated to increased Hsp70 content in human glioblastoma cell lines. *International Journal of Oncology*, v.25, p. 777-785, 2004.

ROSLIN, M., HENRIKSSON, R., BERGSTROM, P., UNGERSTEDT, U., BERGENHEIM, A.T. Baseline levels of glucose metabolites, glutamate and glycerol in malignant glioma assessed by stereotactic microdialysis. *Journal of Neuro-Oncology*, v.61, p.151-160, 2003.

ROTHSTEIN, J.D., DYKES-HOBERG, M., PARDO, C.A., BRISTOL, L.A., JIN, L., KUNCL, R.W., KANAI, Y., HEDIGER, M.A., WANG, Y., SCHIELKE, J.P., WELTY, D.F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, v.16, p. 675-686, 1996.

ROTHSTEIN, J.D., MARTIN, L., LEVEY, A.I., DYKES-HOBERG, M., JIN, L., WU, D., NASH, N., KUNCL, R.W. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, v.13, p. 713-725, 1994.

RZESKI, W., TURSKI, L., IKONOMIDOU, C. Glutamate antagonists limit tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, p. 6372-6377, 2001.

SALMAGGI, A., RIVA, M., SILVANI, A., MERLI, R., TOMEI, G., LORUSSO, L., RUSSO, A., MARCHIONI, E., IMBESI, F. Lombardia Neuro-oncology Group. A multicentre prospective collection of newly diagnosed glioblastoma patients in Lombardia, Italy. *Neurological Sciences*, v.26, p.227-234, 2005.

SARKARIA, J. N., CARLSON, B.L., SCHROEDER, M.A., GROGAN, P., BROWN, P.D., GIANNINI, C., BALLMAN, K.V., KITANGE, G.J., GUHA, A., PANDITA, A., JAMES, D. Use of an Orthotopic Xenograft Model for Assessing the Effect of Epidermal Growth Factor Receptor Amplification on Glioblastoma Radiation Response. *Clinical Cancer Research*, v. 12, p. 2264-2271, 2006.

SATO, H., TAMBA, M., ISHII, T., BANNAI, S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, p.11455-11458, 1999.

SAWYER, A. J., PIEPMEIER, J.M., SALTZMAN, W. M. New Methods for Direct Delivery of Chemotherapy for Treating Brain Tumors. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 79, p.141-152, 2006.

SCHUNEMANN, D.P. Investigação do efeito do glutamato sobre o conteúdo de rEGF em linhagens celulares derivadas de glioblastomas humanos estabelecidas e caracterizadas, Canoas, 2006. Tese (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) – Universidade Luterana do Brasil.

SCHUNEMANN, D.P., GRIVICICH, I., REGNER, A., LEAL, L.F., DE ARAUJO, D.R., JOTZ, G.P., FEDRIGO, C.A., SIMON, D., DA ROCHA, A.B. Glutamate Promotes Cell growth by EGFR signaling on U-87 Human Glioblastoma Cell Line. *Pathology. Oncology Research*, 2009.

SHARMA, S., NEALE, M.H., DI NICOLANTONIO, F., KNIGHT, L.A., WHITEHOUSE, P.A., MERCER, S.J., HIGGINS, B.R., LAMONT, A., OSBORNE, R., HINDLEY, A.C., KURBACHER, C.M., CREE, I.A. Outcome of ATP-based tumor chemosensitivity assay directed chemotherapy in heavily pre-treated recurrent ovarian carcinoma. *BMC Cancer*, v.3, p.19, 2003.

SNEED, P.K., GUTIN, P.H., LARSON, D.A., MALEC, M.K., PHILIPS, T.L., PRADOS, M.D., SCHARFEN, C.O., WEAVER, K.A., WARA, W.M. Patterns of recurrence of glioblastoma multiforme after external irradiation followed by implant boost. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 29, p. 719-727, 1994.

SONTHEIMER, H. Malignant gliomas: perverting glutamate and ion homeostasis for selective advantage. *Trends in Neurosciences*, v.26, p.543-549, 2003.

SONTHEIMER, H. A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *Journal of Neurochemistry*, v.105, p.287-295, 2008.

STUPP, R., MASON, W.P., VAN DEN BENT, M.J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M.J., BELANGER, K., BRANDES, A.A., MAROSI, C., BOGDAN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R.C., LUDWIN, S.K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J.G., EISENHAEUER, E., MIRIMANOFF, R.O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, v.352, p.987-996, 2005.

SWARTLING, F.J. Identifying candidate genes involved in brain tumor formation. *Upsala Journal of Medical Sciences*, v.113, p. 1-38, 2008.

TAKANO, T., LIN, J.H., ARCUINO, G., GAO, Q., YANG, J., NEDERGAARD, M. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Medicine*, v.7, p.1010-1015, 2001.

VAN DEN BENT, M.J., AFRA, D., DE WHITE, O. EORTC Radiotherapy and Brain Tumor Groups and the UK Medical Research Council: Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: The EORTC 22845 randomised trial. *Lancet*. v.366, p. 985-990, 2005.

VANHOUTTE, N., HERMANS, E. Glutamate-induced glioma cell proliferation is prevented by functional expression of the glutamate transporter GLT-1. *FEBS Letters*, v.582, p.1847-1852, 2008.

- VAN VUURDEN, D.G., YAZDANI, M., BOSMA, I., BROEKHUIZEN, A.J., POSTMA, T.J., HEIMANS, J.J., VAN DER VALK, P., ARONICA, E., TANNOUS, B.A., WURDINGER, T., KASPERS, G.J., CLOOS, J. Attenuated AMPA receptor expression allows glioblastoma cell survival in glutamate-rich environment. *PLoS One*, v.4, p. 5953, 2009.
- VOSKOGLOU-NOMIKOS, T., PATER, J.L., SEYMOUR, L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clinical Cancer Research*, v.9, p.4227-4239, 2003. Review.
- WATTERS, D. Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunology and Cell Biology*, v.77, p.263-271, 1999.
- WATKINS, J.C. L-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. *Biochemical Society Transactions*, v.28, p. 297-309, 2000.
- WILLIAMS, J.R., ZHANG, Y., ZHOU, H., GRIDLEY, D.S., KOCH, C.J., SLATER, J.M., LITTLE, J.B. Overview of radiosensitivity of human tumor cells to low-dose-rate irradiation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, v.72, p.909-917, 2008.
- WRENNSCH, M., MINN, Y., CHEW, T., BONDY, M., BERGER, M. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology*, v.4, p.278-299, 2002.
- XUE, D., ALBRIGHT, R.E. Jr. Microcomputer-based technique for 3-D reconstruction and volume measurement of computed tomographic images. Comparison of geometric and planimetry post-operative tumor volume effects on patient survival. *Computers in Biology and Medicine*, v.29, p. 377-392, 1999.
- YANG, M.S., CHAN, H.W., YU, L.C. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*, v.226, p.126-130, 2006.
- YAO, K.C., KOMATA, T., KONDO, Y., KANZAWA, T., KONDO, S., GERMANO, I.M. Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *Journal of Neurosurgery*, v.98, p. 378-384, 2003.
- YE, Z.C., ROTHSTEIN, J.D., SONTHEIMER, H. Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *The Journal of Neuroscience*, v.19, p.10767-10777, 1999.
- YE, Z.C., SONTHEIMER, H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Research*, v.59, p. 4383-4391, 1999.
- ZENGIN, E., ATUKEREN, P., KOKOGLU, E., GUMUSTAS, M.K., ZENGIN, U. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in different types of intracranial

tumors within their relative peritumoral tissues. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v.111, p.345-351, 2009.

ZHONG, W., YAN,T., LIM, R., OBERLEY, L.W. Expression of Superoxide Dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in glioma cells. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 27, p. 1334-1345, 1999.

## **Anexos**



## Anexo 1. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



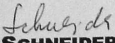
**UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL**  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS E ANIMAIS

### TERMO DE AVALIAÇÃO E APROVAÇÃO

O projeto de pesquisa, intitulado **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CULTIVOS PRIMÁRIOS DERIVADOS DE GLIOMA HUMANO**, protocolado no CEP-ULBRA sob o número **2003-098H**, de responsabilidade do (a) pesquisador (a) e professor (a) **DRª ADRIANA BRONDANI DA ROCHA**, com a colaboração de Andréa Pereira Regner, Daniel Pretto Schunemann, Sabrina Esteves de Matos Almeida, Jorge Vladimir Junqueira Bizzi, Ivana Grivicich, Ivan Chemale e Daniel Simon, foi avaliado e **APROVADO** pelo plenário do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e Animais da ULBRA, na reunião ordinária realizada em trinta de outubro do corrente ano, estando de acordo com as normas vigentes na **Resolução Nº196/96** do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, e em suas complementares (**Resoluções 240/97, 251/97, 292/99, 303/00 e 304/00** do CNS/MS) que regulamentam a pesquisa envolvendo seres humanos.

O (a) pesquisador (a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a este CEP, informando os resultados parciais do projeto, bem como comunicar a data de conclusão da pesquisa.

Canoas, 07 de novembro de 2003.

  
**DR. JOSÉ SCHNEIDER SANTOS**  
Coordenador do CEP-ULBRA

## Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

**Título da pesquisa:** Caracterização molecular de cultivos primários de gliomas humanos.

O estudo da biologia do câncer é extremamente importante para a busca de novas alternativas terapêuticas. Este estudo tem como principal objetivo caracterizar diversos aspectos da progressão tumoral das neoplasias cerebrais primárias durante o cultivo celular e comparar os resultados obtidos à realidade do tratamento clínico do paciente portador desta neoplasia. Após a conformidade com o estudo será realizado um questionário sobre a apresentação e a evolução clínica e radiológica do tumor. Concomitantemente, será coletada uma amostra de sangue venoso para realização de testes laboratoriais. Após a cirurgia de retirada do tumor será coletado microfragmentos da peça cirúrgica. Os microfragmentos serão enviados para o CPCM onde as células tumorais serão mantidas em cultivo celular para realização de testes laboratoriais. Durante o acompanhamento da evolução clínica, após o procedimento cirúrgico, será coletada uma amostra de sangue venoso a cada dois meses para acompanhamento dos testes laboratoriais realizados. Os procedimentos realizados neste estudo são de mínimo risco a integridade do paciente. Os riscos incluem hematomas no local da punção venosa e trombose venosa superficial do vaso puncionado. Não haverá desconforto adicional aos pacientes durante a realização do estudo. Por fim, ressaltamos que a concordância em participar deste estudo não implicará em qualquer modificação nas condutas de sua equipe de atendimento médico.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações. Todas as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informado que caso existirem danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Data: / / .

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)