

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Karen Andrinéia de Oliveira

**MODULAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO POR
CISPLATINA EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO E
ASTRÓCITOS CORTICAIS DE RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof^ª. Dr.^a. Claudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

Co-orientadora: Prof^ª. Dr.^a. Carla I. Tasca.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira, Karen Andrinéia de
Modulação do sistema glutamatérgico por cisplatina em
células de glioma humano e astrócitos corticais de ratos
[dissertação] / Karen Andrinéia de Oliveira ; orientadora,
Cláudia Beatriz Nedel Mendes-de-Aguiar ; co-orientadora,
Carla Inês Tasca. - Florianópolis, SC, 2013.
68 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

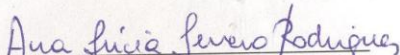
1. Neurociências. 2. glioma. 3. sistema glutamatérgico.
4. resistência. 5. cisplatina. I. Mendes-de-Aguiar,
Cláudia Beatriz Nedel. II. Tasca, Carla Inês. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências. IV. Título.

KAREN ANDRINÉIA DE OLIVEIRA

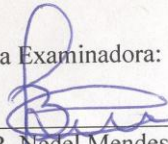
**“MODULAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO
POR CISPLATINA EM CÉLULAS DE GLIOMA
HUMANO E ASTRÓCITOS CORTICAIS DE RATOS”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

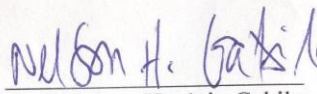
Florianópolis, 28 de fevereiro de 2013.


Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Coordenadora do Curso

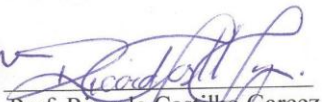
Banca Examinadora:



Profa. Cláudia B. Nedel Mendes de Aguiar
Orientadora – UFSC



Prof. Nelson Horácio Gabilan
Membro - UFSC



Prof. Ricardo Castillo Garcez
Membro externo ao Programa



Prof. Rodrigo Bairy Leal
Membro - UFSC

Dedico este trabalho a minha mãe, Geneci, e ao meu irmão, Mauricio. Pelo amor e carinho eternos e pela fé que sempre depositaram em mim. E dedico à memória de meu pai, Erotildes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente as pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe, Geneci, que é durante os últimos 21 anos foi também meu pai, pela imensa dedicação, pelos ensinamentos, pela força, amor incondicional e carinho que alicerçam a minha vida e me estimulam a ser alguém melhor; ao meu irmão, Mauricio, pela amizade, cumplicidade, amor, por sempre acreditar na minha capacidade e estar sempre disposto a me ajudar;

Agradeço a professora orientadora Dra. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade, por acreditar e valorizar meu trabalho e pelos conselhos sempre dados prontamente. Registro aqui meu muito obrigada e minha estima;

À professora co-orientadora Dra Carla Inês Tasca, pelos ensinamentos, pela paciência, pela ajuda na execução, nas ideias, além da gratidão por fornecer subsídios sem os quais este trabalho não seria possível;

Aos meus familiares: minha prima, Cássia, por toda amizade, incentivo e companheirismo ao longo da minha vida; A todos os meus familiares que de alguma forma ajudaram na minha formação; Aos meus tios e tias que sempre incentivaram a minha jornada; As minhas avós, Nita e Verônica, que sempre foram exemplos de força e perseverança;

As minhas amigas eternas, Caroline Juchem, Jane Pelegrinello e Isabella Tomazini, obrigada por fazerem parte da minha vida, me incentivando e valorizando minhas conquistas sempre;

Aos meus amigos da graduação, Bruno Carvalho e Natália Tambellini, mesmo estando longe, a amizade e o apoio de vocês é sempre fundamental;

A minha amiga Juliana Fabris, por todo o incentivo, ajuda e amor fraterno. A tua presença na minha vida tornou a realização desse sonho possível;

A todos os colegas e amigos do laboratório de Neuroquímica 4, pela receptividade, paciência, mas principalmente pela parceria e conviência agradáveis! Obrigada Débora, Leandra e Fabi pelas conversas e experiências trocadas! Obrigada Samuel e Wagner pela parceria e risadas! Um agradecimento especial a Tharine Dal-Cim, por todos os ensinamentos, paciência, conversas e conselhos que me ajudaram muito ao logo desse tempo, admiro tua dedicação e agradeço pela tua amizade! A Flavia Lopes pela disponibilidade e ajuda;

Aos sempre parceiros Paula Daminelli, Paulo Silveira e Suelene Neotti obrigada pelas conversas, conselhos e parceria sempre!

Agradeço ao Luiz Souza pela ajuda nas dosagens de glutatona.

Aos professores integrantes do Programa de Pós-graduação em Neurociências pelos ensinamentos passados durante o curso e também fora dele.

A Pós-Graduação em Neurociências e ao secretário do curso, Nivaldo pela solicitude e dedicação;

A CAPES pelo financiamento da bolsa auxílio;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, de forma direta ou indireta.

“Man has always been drawn to the sea, but it's an unnatural setting for us, a place of great danger. Tides, currents, waves, wind each presenting their own hazards, none of which can be ignored. The slightest lapse of judgment can be a mistake you might never recover from. But a good sailor doesn't fight against these elements. A good sailor works with them, using them to his advantage. While others less fortunate might be forever cast adrift often in several pieces. He always comes home safely.”

Dexter Morgan

RESUMO

Gliomas malignos constituem um grupo heterogêneo de tumores, com origem em precursores astrocíticos, abrangendo cerca de 70% de todos os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC). Mesmos havendo diversos estudos relacionados e tratamentos, os prognósticos dos pacientes acometidos por esses tumores permanecem ruins. Dentre os tratamentos utilizados o quimioterápico cisplatina (CDDP) é um agente alquilante com atividade antineoplásica. Apesar do amplo espectro de atividade no tratamento de câncer, muitos mecanismos de resistência a essa droga já foram relatados. Gliomas exibem diversos mecanismos de resistência à quimioterapia, além disso, apresentam uma importante alteração no sistema glutamatérgico própria de seu desenvolvimento, que confere resistência, auxiliando na invasibilidade e agressividade tumoral. Assim, objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da CDDP sobre o sistema glutamatérgico e mecanismos de resistência em células de glioma humano A172, bem como em culturas primárias de astrócitos corticais de ratos neonatos. CDDP nas concentrações entre 500 e 1000 μM apresenta efeito citotóxico em células de glioma humano. No entanto, astrócitos corticais primários foram mais sensíveis à exposição a CDDP, apresentando diminuição da viabilidade em menores concentrações (50 e 100 μM). CDDP 100 μM diminuiu a captação de glutamato tanto em células de glioma A172 quanto em astrócitos corticais, entretanto a CDDP 50 μM apresentou esse efeito apenas nas células de glioma A172. CDDP (50 e 100 μM) aumentou a liberação de glutamato tanto na linhagem de glioma humano quanto nos astrócitos corticais. Em se tratando de transportadores de glutamato, foram observados os níveis de expressão do EAAT-2 em células A172 tratadas com CDDP, sendo que as concentrações que alteraram o transporte não modificaram os níveis de expressão desse transportador. A implicação do trocador cistina-glutamato (sistema Xc^-) no aumento da liberação de glutamato em gliomas já é bem descrita, entretanto CDDP (50 e 100 μM) não alterou seus níveis de expressão em células de glioma. CDDP não modificou os níveis totais de glutatona, entretanto o inibidor do sistema Xc^- (sulfassalazina) causou evidente diminuição desses níveis, demonstrando a implicação da atividade do sistema Xc^- nas defesas antioxidantes de células de glioma. A inibição do sistema Xc^- preveniu o aumento da liberação de glutamato causado pela CDDP. E o tratamento concomitante com CDDP e sulfassalazina não alterou a viabilidade em células de glioma, sugerindo que a resistência à CDDP apresentada por estas células nas concentrações testadas, ocorre por um mecanismo

diferente que a produção de glutathione. Esses resultados apontam que a CDDP pode aumentar o potencial invasivo e agressivo de células de glioma humano A172, elevando níveis extracelulares de glutamato através da modulação da atividade de transportadores glutamatérgicos.

Palavras-chave: Glioma, CDDP, sistema glutamatérgico, modulação.

ABSTRACT

Malignant gliomas are a tumor heterogeneous group, with astrocytic origin, embracing nearly 70% of Central Nervous System (CNS). Despite several studies and treatments used the patients prognostic remains low. Among the treatments used there is cisplatin (CDDP) which is alkylant agent with antineoplastic activity. Although wide activity spectrum in cancer treatment, many resistance mechanisms to CDDP have been reported. Gliomas exhibit several resistance mechanisms to chemotherapy, moreover presents an important alteration in glutamatergic system of their own development, which confers resistance, assisting their invasiveness and tumor aggressivity. Thus, the aim of this study was evaluate the CDDP effect in glutamatergic system in human glioma cells A172 and in primary rats cortical astrocytes. CDDP concentrations between 500 and 1000 μM are cytotoxic to human glioma cells. However cortical astrocytes are more sensible to CDDP exposition, presenting viability decrease in lower concentrations (50 and 100 μM). CDDP 100 μM diminished glutamate uptake both in glioma cells A172 and in cortical astrocytes, however CDDP 50 μM only present this effect in human glioma cells. CDDP (50 -100 μM) increase glutamate release, in human glioma cell line and in cortical astrocytes. In the case of glutamate transporter, was observed EAAT-2 expression levels, in A172 cells CDDP treated, whereas the concentrations that changed the transport do not entailed modifications in EAAT-2 expression. The cystine-glutamate exchanger (system Xc^-) involvement in glutamate release in glioma cells is well described, however CDDP (50 and 100 μM) do not alter system Xc^- expression levels. CDDP concentrations do not modify glutathione levels, but the system Xc^- inhibitor (sulfasalazine) caused apparent decrease in glutathione levels, showing that the system Xc^- activity involvement in antioxidant defenses in human glioma cells A172. The system Xc^- inhibition prevents the increase in glutamate release entailed by CDDP. Even the concomitant treatment with CDDP and sulfasalazin do not alter cell viability in human glioma cells, suggesting that the CDDP resistance presented by A172 cells, in tested concentrations, occurs by a mechanism different of glutathione produce. These results indicate that CDDP may increase the A172 glioma cells invasiveness potential and agressivity, raising extracellular glutamate levels by modulation of glutamate transporters activity.

Keywords: Glioma, CDDP, glutamatergic system, modulation.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1	Esquema de uma sinapse glutamatérgica.....	26
Figura 2	Mecanismo de necrose induzida por excitotoxicidade glutamatérgica em gliomas.....	28
Figura 3	Vias moleculares ativadas pelo acúmulo de glutamato extracelular em gliomas	30
Figura 4	Representação da estrutura química da cisplatina (CDDP).....	32

RESULTADOS

Figura 1	Baixas concentrações de CDDP não alteram a viabilidade de células de glioma humano A172.....	43
Figura 2	Baixas concentrações de CDDP reduzem a viabilidade em astrócitos corticais, mas não exercem esse efeito na viabilidade de células de glioma humano.....	45
Figura 3	Células de glioma humano A172 apresentam diminuição na captação de glutamato e aumento na liberação de glutamato quando comparadas a astrócitos corticais primários.....	46
Figura 4	CDDP é capaz de diminuir a captação de glutamato em células de glioma humano A172 e em astrócitos corticais.....	48
Figura 5	CDDP causou aumento na liberação de glutamato por astrócitos corticais e células A172.....	49
Figura 6	O tratamento com CDDP não causou alteração na expressão do transportador de glutamato dependente de sódio-EAAT-2 em células de glioma A172.....	50
Figura 7	Imunocitoquímica com marcação para EAAT-2 em astrócitos não tratados e células de glioma A172 tratadas com CDDP.....	51
Figura 8	CDDP não causou alteração na expressão do sistema Xc^- em células de glioma humano A172.....	53

Figura 9	Os níveis de glutathiona total não sofreram alteração com tratamento com CDDP em células de glioma A172 embora a inibição do sistema Xc^- tenha diminuído os níveis de glutathiona.....	54
Figura 10	A inibição do sistema Xc^- previniu o aumento na liberação de glutamato causada pela CDDP em células de glioma humano A172.....	55
Figura 11	A inibição do sistema Xc^- não altera a viabilidade celular em células de glioma humano A172.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4F2hc	Cadeia pesada do sistema Xc
A172	Linhagem de glioma humano
ACNU	Nimustina
AEG-1	Gene de astrócito elevado tipo 1
AKT	Proteína cinase B
AMPA	Ácido Alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
ATP	Adenosina trifosfato
BCNU	Carmustina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHC	Barreira hematoencefálica
BSO	Butionina sulfoximina
Ca ²⁺	Íons cálcio
CCNU	Lomustina
CD133 ⁺	Marcador de célula tronco
CO ₂	Gás carbônico
CDDP	Cis-diamminedicloroplatinum (II)
DMEM-F12	Meio de Eagle modificado por Dulbeco contendo HAM F12
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
EAAC1	Carreador de aminoácidos excitatórios
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatórios
EAAT-1	Transportador de aminoácido excitatório tipo 1
EAAT-2	Transportador de aminoácido excitatório tipo 2
EAAT-3	Transportador de aminoácido excitatório tipo 3
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
Fas	Receptor de morte da família TNF
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i> , órgão americano que controla o consumo e administração de substâncias
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLAST	Transportador de glutamato/aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato 1
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato

GSH	Glutathiona
HBSS	Solução tampão de Hank
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
iGluR	Receptor ionotrópico de glutamato
K ⁺	Íon potássio
KA	Ácido cálcico
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
mTOR	proteína alvo de rapamicina em mamíferos
MTT	Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio
Na ⁺	Íon sódio
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba de sódio/potássio
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Gene supressor de tumor
p73	Gene da família do p53
PBS	Tampão fostato salina
PCA	Ácido perclórico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFRA	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas tipo A
PI3K	Proteína cinase de fosfatidilinositol 3
RAS	Fator de crescimento
ROH	Espécies reativas de oxigênio neutralizadas
ROOH	Espécies reativas de oxigênio
SAS	Sulfasalazina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNARE	Receptor de ligação vesicular
SNC	Sistema nervoso central
TGF-α	Fator de transformação do crescimento tipo alfa
TMZ	Temozolomida
TNB	Ácido-5-mercapto-2-nitrobenzóico
TNF-α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
VGLuT	Transportador vesicular de glutamato
Xc ⁻	Trocador cistina-glutamato
xCT	Subunidade catalítica do sistema Xc ⁻

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	GLIOMAS.....	21
1.1.1	Gliomas e Glutamato.....	22
1.2	SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	23
1.2.1	Receptores e Transportadores Glutamatérgicos.....	24
1.2.2	Função dos astrócitos na transmissão glutamatérgica.....	25
1.2.3	Excitotoxicidade glutamatérgica e morte neuronal.....	27
1.3	QUIMIOTERAPIA E GLIOMAS.....	29
1.3.1	Cisplatina e gliomas.....	32
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.1.1	Objetivos Específicos.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	CULTURAS CELULARES.....	37
3.1.1	Cultura celular da linhagem de glioma humano A172.....	37
3.1.2	Cultura primária de astrócitos corticais de ratos.....	37
3.2	TRATAMENTO CELULAR.....	37
3.3	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CDDP NA VIABILIDADE CELULAR.....	38
3.4	AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA CDDP NO TRANSPORTE GLUTAMATÉRGICO.....	38
3.4.1	Captação de glutamato em células de glioma humano A172 e astrócitos corticais.....	38
3.4.2.1	Dosagem de proteína para captação de glutamato.....	39
	Análise da liberação de glutamato em células A172 e astrócitos corticais.....	39
3.4.3	Análise do efeito da CDDP sobre expressão dos transportadores de glutamato EAAT-2 e sistema Xc⁻.....	40
3.4.3.1	Imunodeteção de proteínas.....	40
3.4.3.1.1	Preparação da amostras.....	40
3.4.3.1.2	Dosagem de proteínas.....	40
3.4.3.1.3	Separação de proteínas.....	40
3.4.3.1.4	Eletrotransferência e imunodeteção.....	40
3.4.3.2	Imunocitoquímica.....	41

3.5	ANÁLISE DO EFEITO DA CISPLATINA SOBRE DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	41
3.5.1	Dosagem dos níveis intracelulares de glutathiona (GSH) em células A172.....	41
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4	RESULTADOS.....	43
4.1	CDDP apresenta citotoxicidade em astrócitos corticais em baixas concentrações, mas não altera a viabilidade em células de glioma humano A172.....	43
4.2	Células de glioma humano A172 apresentam diminuição na captação de glutamato e aumento da liberação de glutamato quando comparadas a astrócitos corticais de ratos neonatos.....	44
4.3	CDDP foi capaz de diminuir a captação de glutamato e aumentar a liberação de glutamato em astrócitos corticais e em células de glioma humano A172.....	47
4.4	CDDP não acarretou em alterações nos níveis totais de glutathiona e a inibição do sistema Xc^- causou uma diminuição significativa nos níveis de GSH em células de glioma humano A172.....	52
4.5	A inibição do sistema Xc^- previne o aumento na liberação de glutamato causada pela CDDP, mas não causa alterações na viabilidade celular em células de glioma humano A172.....	52
5	DISCUSSÃO.....	57
6	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS

Gliomas malignos correspondem a um grupo heterogêneo de tumores, com ocorrência no Sistema Nervoso Central (SNC). Tais tumores podem ter origem em alterações de células gliais ou de seus progenitores (Jiang e Uhrbom, 2012). O tipo celular precursor de glioma ainda permanece controverso. Singh e colaboradores (2004) sugerem como origem do glioma maligno as células tronco neurais CD133⁺. Contudo, existem estudos que apontam células precursoras de oligodendrócitos ou astrócitos, com alterações em seu funcionamento normal, que poderiam engatilhar processos de formação de tumores malignos como gliomas (Liu *et al*, 2011; Persson *et al*, 2010).

Os gliomas abrangem a maioria dos tumores do SNC, chegando a números próximos de 18.000 novos casos por ano, sendo cerca de 70% de todas as neoplasias do SNC, que podem variar amplamente em morfologia, localização e resposta a terapias diversas (Liu *et al*, 2011; Ohgaki e Kleihues, 2009). De acordo com diversos estudos e a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) os gliomas podem ser divididos nos seguintes subtipos: grau I: apresentam células bem diferenciadas, biologicamente benignos, passíveis de cura por cirurgia (*Astrocitoma pilocítico*); grau II: considerados malignos, com infiltração precoce nos tecidos adjacentes, bem diferenciado, crescimento lento, podendo progredir para astrocitoma anaplásico, incurável por cirurgia (*Astrocitoma difuso*, *Oligodendroglioma e Oligoastrocitoma*); grau III: apresenta altas taxas de anaplasia e proliferação, com características histológicas malignas e prognósticos desfavoráveis (*Astrocitoma anaplásico e Oligodendroglioma anaplásico*); grau IV: exibem muitas características de malignidade, alta ocorrência de angiogênese e necrose, elevada invasibilidade e baixos prognósticos (*Glioblastoma multiforme*) (Ohgaki e Kleihues, 2005; Louis *et al*, 2007; Ohgaki e Kleihues, 2009; Pojo e Marques, 2011; Westphal e Lamszus, 2011).

Diversas linhagens celulares são utilizadas como modelo de glioma humano. Para tanto, são necessários estudos de suas características de crescimento, desenvolvimento e malignidade por exemplo. Nesse trabalho foi utilizado o modelo de glioblastoma humano A172, o qual constitui um bom modelo de estudo por possuir alta taxa de invasibilidade e penetração nos tecidos adjacentes, onde

podepromover necrose, gerando inflamação e aumento na progressão tumoral (de Riddler, et al., 1987),

O glioblastoma multiforme é o glioma de ocorrência mais comum no SNC. Este tipo de glioma também é considerado o mais agressivo, sugerindo-se que tenha origem a partir da transformação neoplásica astrocítica. Tal transformação pode desencadear alterações em vias de sinalização já bem descritas em células de câncer, como ativação de tirosinas cinases e perda de proteínas supressoras de tumor. Apesar de muitos estudos sobre esta doença, os prognósticos para este tipo de tumor permanecem ruins, estando a sobrevida em torno de 12 a 15 meses (Ohgaki e Kleihues, 2009; Liu *et al.*, 2011).

Gliomas apresentam alterações em vias de sinalização que promovem a proliferação e sobrevivência celular. Ativação de fatores de crescimento celular através ligação com seus respectivos receptores como, por exemplo, fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento plaquetário tipo A (PDGF), fator de necrose tumoral tipo alfa (TGF- α). Consequente aumento da Proteína cinase de fosfatidilinositol 3 (PI3K) e ativação de moléculas efetoras como Proteína cinase B (AKT) e proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) foram observados em gliomas humanos (Ohgaki et al., 2004). Além das mudanças nativas observadas em tumores não tratados, estudos sugerem a ocorrência de alterações em genes de reparo, decorrentes do uso de quimioterápicos clássicos como a Temozolomida (TMZ) e Lomustina (CCNU) (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

1.1.1 Gliomas e Glutamato

Diversos estudos demonstram a relação entre a alteração do funcionamento do sistema glutamatérgico e o desenvolvimento do glioma. Células de glioma apresentam uma importante diminuição na captação de glutamato, por transportadores dependentes de sódio (Na^+), quando comparadas a astrócitos saudáveis. O decréscimo na captação de glutamato por células de glioma é devido a alterações na expressão dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), com diminuição, perda ou alteração da localização desses. (Ye et al., 1999).

Além de apresentar uma menor captação de glutamato em comparação com astrócitos, os gliomas liberam glutamato via trocador cistina-glutamato. O aumento nos níveis extracelulares de glutamato propicia o aumento da malignidade do tumor, por promover resistência à apoptose, favorecer a proliferação e a invasão aos tecidos

adjacentes, possibilitando a sobrevivência tumoral (Groot e Sontheimer, 2011). A maior liberação de glutamato promovida pelos gliomas possibilita o crescimento e invasão tumoral, estando relacionada com a atividade do sistema Xc^- que possibilita esse aumento, já que sua inibição prejudica a proliferação celular do glioma (Lyons et al., 2007).

Estudos *in vitro* demonstraram que células de glioma são capazes de elevar os níveis de glutamato no meio de cultura, de aproximadamente 1 μM para 100 μM num período de 5 horas. Além disso, as altas concentrações de glutamato acarretam em morte neuronal por excitotoxicidade glutamatérgica por perda da homeostase intracelular do cálcio (Ca^+), em coculturas de células de glioma e neurônios hipocâmpais (Ye e Sontheimer, 1999).

1.2 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

O glutamato é um aminoácido excitatório que desempenha um papel essencial ao SNC como sinalizador químico (Danbolt, 2001). Esse neurotransmissor atua de diversas formas para manter a atividade nervosa central, estando intimamente relacionado a processos plásticos associados ao desenvolvimento, à aprendizagem e à memória (Meldrum, 2000).

Além de sua fundamental função como neurotransmissor, o glutamato relaciona-se a diversos processos, como precursor para síntese do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico, neurotransmissor inibitório (GABA). Assim participando como substrato energético no metabolismo intermediário; fazendo parte da composição de diferentes derivados de aminoácidos como proteínas e do peptídeo antioxidante glutathiona (Danbolt, 2001).

No SNC o glutamato pode ser sintetizado a partir da glicose, que é captada pelos astrócitos e através da ação da enzima glicogênio sintetase é convertida em glicogênio ou a piruvato, via glicólise. Parte do piruvato é convertido a α -cetoglutarato, no ciclo do ácido cítrico, então recebendo um grupo amino de outro aminoácido através de uma reação de transaminação, dando origem ao glutamato (Lomako et al., 1993; Siegel et al., 2006). Outra via de produção do glutamato é a partir da glutamina, no ciclo glutamato-glutamina, no qual a glutamina é transportada dos astrócitos para os neurônios.

1.2.1 Receptores e Transportadores Glutamatérgicos

Os receptores de glutamato estão divididos em duas categorias: os receptores ionotrópicos (iGluR), sendo estes canais iônicos multiméricos, cuja união ao glutamato altera sua conformação possibilitando o influxo de íons; e os receptores metabotrópicos (mGluR) que não são capazes de ativar fluxos iônicos, mas sim da ativação de enzimas intracelulares pelo acoplamento a proteínas G (Kew e Kemp, 2005).

Os receptores ionotrópicos são subdivididos em três classes, cuja nomenclatura foi atribuída de acordo com a seletividade aos seus agonistas: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico (AMPA) e cainato (KA) (Kew e Kemp, 2005). Com relação aos mGluR, foram identificados 8 tipos nomeados de 1 a 8. Tais receptores foram divididos em 3 classes de acordo com equivalência da sequência de aminoácidos, seletividade farmacológica e vias de transdução de sinal (Kenny e Markou, 2004). Os mGluR do tipo I (mGluR 1 e 5) tem localização pós-sináptica e estão relacionados à ativação da fosfolipase C e liberação de íons Ca^+ intracelular. Os mGluR do tipo II (mGluR 2 e 3) tem localização pré e pós-sináptica, estando acoplados à ação da proteína G inibitória. Os receptores do tipo III (mGluR 4, 6, 7 e 8) atuam como autorreceptores e estão acoplados à proteína G. Os tipos II e III participam da modulação da atividade da adenilato ciclase (Kew e Kemp, 2005; Kim et al., 2008)

Existe uma regulação fina dos níveis de glutamato na fenda sináptica, através do equilíbrio entre a liberação de glutamato e a retirada do neurotransmissor da fenda. Essa regulação mantém a integridade da transmissão sináptica (Rothstein et al., 1993; Kanai e Hediger, 2003). A retirada do glutamato pode ser realizada pelo neurônio pré-sináptico, ou pelas células gliais próximas ao terminal, sendo essas células responsáveis pela retirada rápida do neurotransmissor do espaço extracelular (Groot e Sontheimer, 2011). Existe uma categoria de proteínas que realiza o transporte de glutamato através da membrana de maneira dependente de Na^+ , os EAATs. Em células gliais existem dois transportadores principais, o EAAT 1, também denominado GLAST e o EAAT 2, ou GLT-1. Além dos transportadores gliais de glutamato, existe o carreador de aminoácidos excitatórios 1 (EAAC1 – homólogo humano, EAAT3), encontrado em neurônios, largamente distribuído no cérebro, porém de ocorrência em regiões não-sinápticas (Danbolt 2001).

1.2.2 Astrócitos e transmissão glutamatérgica

No tecido cerebral normal, os astrócitos estão envolvidos em diversas funções críticas relacionadas à homeostase do SNC, dentre elas a síntese e secreção de fatores de crescimento, de proteínas da matriz extracelular, balanço iônico e regulação hídrica (Dow e Wang, 1998, Mendes-de-Aguiar et al., 2010). Ademais, os astrócitos estão intimamente relacionados à transmissão e regulação glutamatérgica, atuando na remoção do glutamato da fenda sináptica (Carmignoto, 2000; Laming et al., 2000).

A captação de glutamato ocorre principalmente através da atividade dos EAATs citados anteriormente. A ativação dos EAATs astrocitários é intimamente associada aos níveis extracelulares de glutamato e sua homeostase (Danbolt, 2001; Dun et al., 2006; Guillet et al., 2005; Re et al., 2003). A retirada do glutamato da fenda sináptica pelos transportadores dependentes de Na^+ ocorre através da ligação do glutamato ao transportador, juntamente com dois íons Na^+ e um próton. Isto acarreta uma mudança conformacional do transportador, possibilitando a entrada do glutamato e dos íons Na^+ e o próton, concomitante à saída de um íon K^+ . Este mecanismo depende da atividade da Na^+/K^+ ATPase para manutenção do gradiente iônico da membrana, o que exige um grande gasto energético (Camacho e Massieu, 2006).

Após a captação astrocítica de glutamato, este reage com amônia formando a glutamina, pela ativação da enzima astrocitária glutamina sintetase. Os astrócitos liberam a glutamina que é captada por neurônios, onde ocorre sua hidrolização, pela ação da glutaminase ativada por fosfato produzindo novamente glutamato, constituindo assim o ciclo glutamato-glutamina (Schousboe e Waagerpetersen, 2005; Groot e Sontheimer, 2011)(Figura 1).

A captação de glutamato realizada pelos astrócitos é de suprema importância para a manutenção de níveis extracelulares de glutamato em concentrações fisiológicas prevenindo a excitotoxicidade glutamatérgica (Danbolt, 2001; Schousboe e Waagerpetersen, 2005).

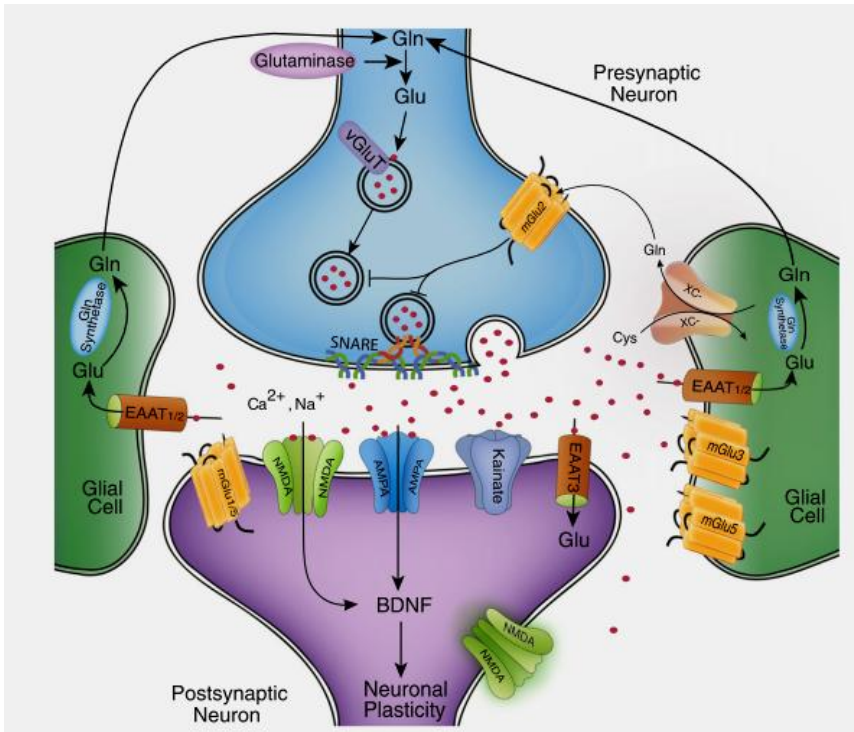


Figura 1. Esquema de uma sinapse glutamatérgica: Neurônios liberam glutamato (Glu) na fenda sináptica, o qual interage com seus receptores de membrana (NMDA, AMPA, KA, e mGluR). A retirada do glutamato do espaço extracelular ocorre pela atividade dos transportadores de glutamato na membrana de astrócitos (EAAT1 e EAAT2) ou de neurônios (EAAC1 e EAAT3). O sistema Xc⁻ contribui para a reciclagem do glutamato. Após a entrada do glutamato nos astrócitos, este pode ser convertido à glutamina (Gln), pela ação da glutamina sintetase, a glutamina por sua vez, é exportada para o espaço extracelular onde pode ser captada pelos neurônios, onde é convertida a glutamato. Este pode ser vesiculado, através da atividade de vGLUT, para ser liberado de forma dependente de voltagem, pela interação vesicular com proteínas do complexo SNARE. NMDA-R, receptor N-metil D- aspartato; AMPA-R, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico; KA, kainato; mGluR, receptor metabotrópico de glutamato; EAAT-1, transportador de aminoácido excitatório tipo 1. EAAT-2, transportador de aminoácido excitatório tipo 2; sistema Xc⁻ trocador de cistina-glutamato; vGLUT, transportadores vesiculares de glutamato; SNARE, proteína de ancoragem vesicular; BDNF, fator

neurotrófico derivado do encéfalo (adaptado de Niciu e colaboradores, 2012).

Os astrócitos são também capazes de liberar glutamato para o espaço extracelular por diversos mecanismos, como reversão dos transportadores de glutamato, o trocador cistina-glutamato e canais iônicos regulados por alterações no volume celular, por exemplo, os hemicanais (Parpura et al., 2010).

1.2.3 Excitotoxicidade glutamatérgica e morte neuronal

O termo excitotoxicidade trata de um evento no qual o aumento na concentração glutamatérgica na fenda sináptica, durante a transmissão sináptica, acarreta em morte neuronal (Meldrum, 2000). Os altos níveis de glutamato extracelular podem provocar uma estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos, com efeitos prejudiciais, como influxo massivo de Ca^{2+} e a liberação de óxido nítrico (NO), ativação de proteases e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (Lau e Tymianski, 2010; Wang e Qin, 2010).

A participação do receptor ionotrópico NMDA em eventos de excitotoxicidade já é bem descrita. A excessiva estimulação desses receptores causa um aumento do influxo de Ca^{2+} , atingindo níveis capazes de ocasionar danos e morte celular (Szydłowska e Tymianski, 2010). Tais danos podem estar relacionados à ativação de cascatas tóxicas, como por exemplo, a ativação de enzimas catabólicas como fosfolipases, endonucleases ou proteases como a caspase e calpaína (Mattson, 2003).

O evento de excitotoxicidade é bem descrito em diversas doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer (Cassano et al. 2011), mal de Parkinson (Boll et al., 2011) e depressão (Sanacora, 2008). Em gliomas, a excitotoxicidade glutamatérgica possibilita o desenvolvimento, invasão e progressão tumoral (Ye e Sontheimer, 1999). Os altos níveis de glutamato extracelular desencadeiam diversos mecanismos ao tecido sadio, como a diminuição dos níveis de glutatona, aumento no influxo de Ca^{2+} , influxo de água e íons Na^+ , inchaço celular, ruptura da membrana, tais eventos culminam no aparecimento de necrose e processos inflamatórios, (Figura 2) (Noch e Khalili, 2009).

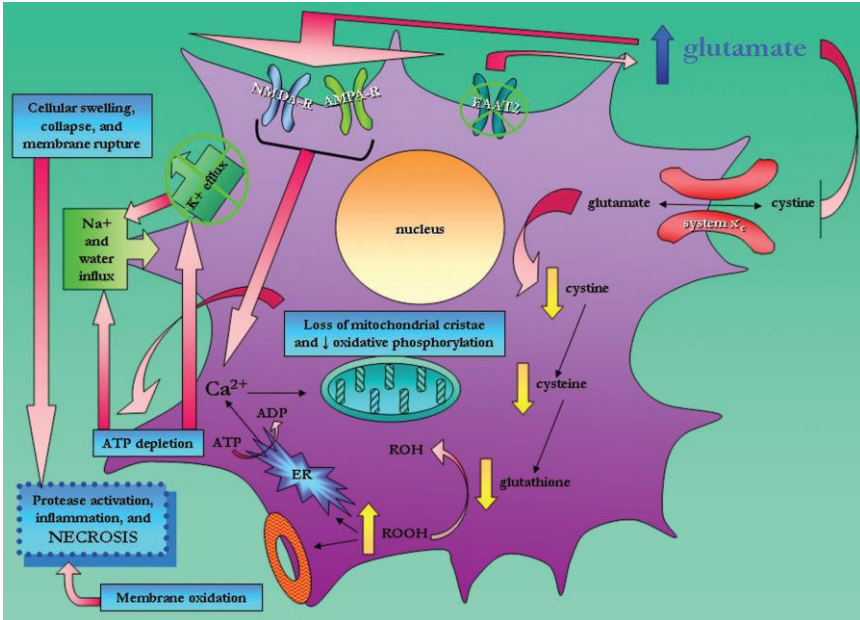


Figura 2. Mecanismo de necrose induzida por excitotoxicidade glutamatérgica em glioma. A acumulação de glutamato como resultado da diminuição da atividade do EAAT-2 engatilha ativação de receptores de glutamato, causando aumento do Ca²⁺ intracelular. Concomitantemente, os níveis extracelulares de glutamato inibem a atividade do sistema X_c⁻. A inibição do sistema X_c⁻ diminui a captação de cistina e consequente produção de glutathione, ocasionando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio pela incapacidade da célula em neutralizar tais elementos. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio acaba por provocar oxidação da membrana e liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático, dependente de ATP, esses eventos ocasionam dano mitocondrial e depleção de ATP. Como consequência, ocorre influxo de água e Na⁺, sendo que o efluxo de K⁺ não mantém a homeostase iônica, provocando aumento no volume celular. Esses eventos implicam no inchaço celular e ruptura da membrana, levando ao colapso celular. O extravazamento do conteúdo intracelular ativa proteases extracelulares, que induzem inflamação e possível necrose. NMDA-R, receptor N-metil D- aspartato; AMPA-R, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico; EAAT-2, transportador de aminiácido excitatório tipo 2; ROOH, espécies reativas de oxigênio;

ROH, espécies reativas de oxigênio neutralizadas (adaptado de Noch e Khalili, 2009).

A excitotoxicidade glutamatérgica em gliomas está relacionada a diversos eventos ao longo da progressão da doença. O aumento na liberação de glutamato está intimamente relacionado à ocorrência de atividade epiléptica associada ao desenvolvimento precoce do tumor. Segundo Buckingham e colaboradores (2011), a inibição do sistema Xc^- , com uso de sulfassalazina, é capaz de eliminar a atividade epiletiforme.

A ativação de vias de sinalização celular que culminam na modulação de citocinas como o fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$), o fator de transcrição nuclear kappa B ($NF\kappa B$), gene de astrócito elevado tipo 1 (AEG-1), e vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida tipo 1 (HIV-1), acarretam na diminuição da captação do glutamato, colaborando para promoção da excitotoxicidade. (Noch e Khalili, 2009; Yoo et al., 2011). Já é relatado que o aumento na liberação de glutamato leva a ativação da via da PI3K-AKT iniciando cascatas de invasão e migração celular como demonstrado na figura 3 (Noch e Khalili, 2009). O excesso de glutamato na fenda sináptica causa um aumento persistente no influxo de Ca^{2+} em neurônios, através da super-ativação de receptores, em especial o subtipo NMDA, acarretando em morte neuronal (Ye e Sontheimer, 1999). Essa morte celular peritumoral possibilita a abertura de espaço para crescimento das células de glioma (Groot e Sontheimer, 2011).

1.3 QUIMIOTERAPIA E GLIOMAS

A utilização de terapias associadas no tratamento de gliomas humanos é cada vez mais comum. A ressecção do tumor é normalmente aliada a terapias adjuvantes, como a quimioterapia e a radioterapia. No caso da quimioterapia, existem importantes fatores limitantes na escolha do quimioterápico de uso, como por exemplo, a capacidade da droga de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) e a heterogeneidade tumoral, tais fatores determinam a responsividade do câncer à terapia (Reardon et al., 2006; Rainov et al., 2006). A presença e atividade de proteínas responsáveis pelo bombeamento de xenobióticos, como a glicoproteína-P, em células tumorais, também é um elemento limitante na escolha do quimioterápico (Dai et al., 2002).

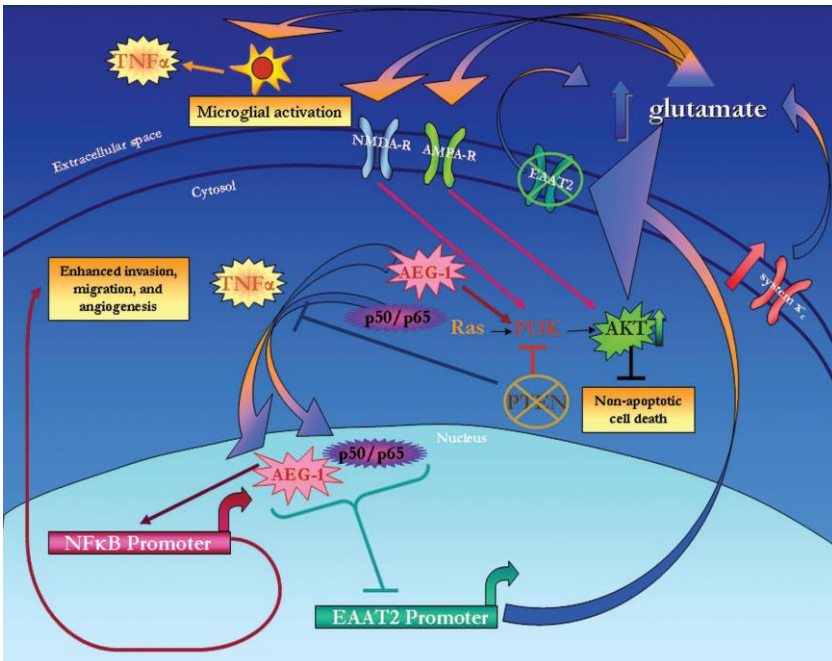


Figura 3. Vias moleculares ativadas pelo acúmulo de glutamato extracelular em gliomas. O aumento na atividade do sistema Xc^- facilita o acúmulo extracelular de glutamato. A interação de glutamato e seus receptores ionotrópicos (AMPA-R e NMDA-R) ativa a via PI3K/AKT, diretamente ligadas à sobrevivência celular. A ativação dessas vias, por sua vez, promove a ativação de AEG-1 e consequente inibição do promotor de EAAT2, causando alteração na sua função. A ativação de AEG-1 também está relacionada a atividade do promotor NF κ B, causando aumento da invasão, migração e angiogênese das células do tumor. AEG-1, gene de astrócito elevado tipo 1; PI3K, proteína cinase de fosfatidilinositol 3; NF κ B, fator de transcrição nuclear kappa B (adaptado de Noch e Khalili, 2009).

Existem diversas opções de agentes quimioterápicos com estudos em andamento para o tratamento de gliomas. Entre eles, podem ser citados os agentes antiangiogênicos, citotóxicos, alquilantes, inibidores da topoisomerase, inibidores de tirosina cinases e antagonistas de receptores de glutamato (Desjardins et al., 2005; Kreisl, 2009). Para

escolha da droga no tratamento é necessário um estudo sobre a origem, desenvolvimento e recorrência do tumor.

Entre as drogas mais utilizadas atualmente, está a Temozolomida (TMZ), que atua na interrupção da replicação do DNA. O tratamento com TMZ vem se mostrando eficaz no tratamento de gliomas diagnosticados precocemente (Desjardins et al., 2005). Entretanto, estudos sugerem a ação da enzima alquilpurina-DNA-N-glicosilase (APGN) como mecanismo de resistência a TMZ, pelo reparo da maioria das lesões citotóxicas causadas pela TMZ (Agnihotri et al., 2012).

As nitrosuréias como carmustina (BCNU) e Lomustina (CCNU) costumam ser empregadas no tratamento de gliomas, pela facilidade em ultrapassar a BHE, contudo, análises sugerem que os benefícios aos pacientes são muito restritos.

O BCNU é um agente utilizado no tratamento de gliomas, administrado por via intravenosa ou ainda em altas concentrações no local do tumor. Todavia, dados clínicos demonstram que a aplicação local de BCNU *wafer*, um disco biodegradável contendo o quimioterápico, é aliada a altas taxas de recorrência local ou difusa, não fornecendo controle duradouro do desenvolvimento tumoral (Dörner et al., 2013).

A CCNU é um quimioterápico de uso oral, pela sua alta lipossolubilidade e capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Com atividade antitumoral de amplo espectro, a CCNU é aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) e aceita no tratamento de tumores cerebrais. Entretanto, seu uso é restrito pela toxicidade hematológica causada nos pacientes (Rosenblum et al., 1973; Carrillo e Munoz, 2012).

A cisplatina (CDDP) é um agente alquilante, com capacidade indutória da morte celular por apoptose e inibir o crescimento celular. É composta por um átomo de platina, cercado por dois átomos de cloro e dois grupos amônia (Ummat et al., 2012) como mostra a figura 4. Possui um longo histórico como agente terapêutico utilizado no tratamento de gliomas. Atualmente, seu uso clínico está aliado ao uso de outros agentes quimioterapêuticos, como o BCNU. Todavia, seu uso é limitado pela intensa toxicidade sistêmica, danos hematológicos e ototoxicidade apresentada por pacientes após os ciclos de quimioterapia (Carrillo e Munoz, 2012).

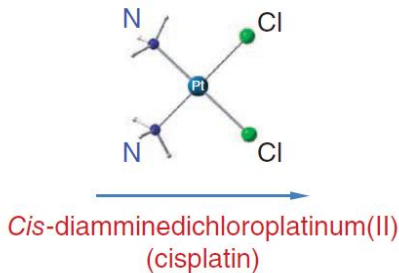


Figura 4. Representação da estrutura química da cisplatina (CDDP). A estrutura química da CDDP é formada por um átomo central de platina, tendo duas ligações com dois átomos de cloro, além de outras duas ligações com dois grupos amônia (adaptado de Ummat, 2012).

Mesmo com o uso de terapias concomitantes, a sobrevida dos pacientes mantém-se insatisfatória, sendo em torno de 12 a 15 meses. Os baixos prognósticos associados a estes pacientes após a quimioterapia estão associados aos diversos mecanismos de resistência a drogas observados nesse tipo de câncer.

1.3.1 Cisplatina e gliomas

A CDDP é um potente quimioterápico, de amplo espectro utilizado há décadas para tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo câncer de ovários, testículos, pescoço e cabeça (Prestayko et al., 1979). A partir dos anos 70, a CDDP foi utilizada por ter como alvo principal o DNA, mas nem todos os seus mecanismos de ação foram elucidados (Siddik, 2003).

O principal mecanismo de ação da CDDP é a formação de adutos no DNA impedindo a replicação do mesmo. Além desse mecanismo esta droga é capaz de interagir com moléculas intracelulares desencadeando outros mecanismos. O dano em proteínas de reconhecimento do DNA causado pela formação de adutos é capaz de influenciar diversas vias que desencadeiam a morte celular apoptose (Siddik, 2003). A ativação da Fas, caspase 8, seguida da ativação da caspase 3, vias associadas a p53 com consequente ativação do citocromo C (Damio et al., 2001), além da p73 (Gong et al., 1999) e são relacionadas a apoptose ocasionada pela CDDP.

Apesar de apresentar diversas atividades citotóxicas contra astrocitomas anaplásicos e glioblastomas multiforme, o uso da CDDP passou a ser restrito em tumores cerebrais pela dificuldade em ultrapassar a BHE (Desjardins et al., 2005). Novos métodos têm sido estudados como estratégias de entrega local de drogas para tratamento de gliomas malignos, na tentativa de superar essa dificuldade. Métodos como a injeção intraneoplásica (Hassenbusch et al., 2003), a inserção do quimioterápico na cavidade após cirurgia (Garfield, 1976), a entrega local por difusão e ainda via convecção facilitada, com uso de bombas de difusão (Allard et al., 2009) são procedimentos diferenciados, que podem apresentar resultados positivos por aumentar a concentração local da droga e evitar o dano sistêmico. Entretanto necessitam de estudos mais específicos para cada tipo de quimioterápico. No caso da CDDP Huo e colaboradores (2012) demonstraram que a entrega local do quimioterápico, seja em lipoestruturas ou livre, é capaz de causar dano severo ao tecido cerebral sadio, com presença de hemorragia, migração de macrófagos e subsequente necrose.

Além da citotoxicidade acarretada pela CDDP, são observados diversos mecanismos de resistência, que podem ocasionar recidiva e diminuição do tempo de sobrevida de pacientes. A resistência pode ser adquirida pela exposição crônica à droga ou por fenômenos intracelulares intrínsecos. A resistência ao fármaco normalmente é de origem multifatorial. A CDDP atua em vários eventos intracelulares, podendo interferir em diversas fases da cadeia de ativação de apoptose, assim sendo, pode conduzir à resistência (Siddik, 2003). Alterações na acumulação, por diminuição da captação da droga, ou aumento no seu efluxo, por bombas de efluxo como a glicoproteína-P (Andrews et al. 1988; Bible et al., 2000; Kelland, 1993), altos níveis intracelulares de tióis (Kelland, 1993) e superexpressão de proteínas ligadas à sobrevivência celular, como PI3K/AKT ou ainda RAS/MAPK (Hung e Lau, 1999) são mecanismos de resistência observados com o uso da CDDP (Siddik, 2003).

Um mecanismo de resistência e sobrevivência celular bem descrito em gliomas está relacionado com alterações no sistema glutamatérgico, como previamente exposto. No entanto, a relação entre alterações no sistema glutamatérgico e o uso da CDDP com o desenvolvimento de resistência ainda não é totalmente compreendido. Além disso, o estudo da relação entre a CDDP e o sistema glutamatérgico pode contribuir com esclarecimento de vias associadas à doença, sendo de grande importância na compreensão dos prognósticos ruins associados a essa doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da Cisplatina na modulação do transporte do aminoácido excitatório glutamato, em glioma A172. Este estudo também teve como objetivo avaliar o efeito da CDDP no transporte glutamatérgico de astrócitos de culturas primárias corticais de ratos Wistar neonatos.

2.1.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito da CDDP sobre a viabilidade em glioma humano e em astrócitos corticais.
- ✓ Verificar o efeito da CDDP na captação e na liberação de glutamato em glioma humano e em astrócitos.
- ✓ Analisar a expressão do transportador astrocitário EAAT-2 e do trocador cistina-glutamato em células de glioma tratadas com CDDP.
- ✓ Avaliar o efeito da inibição do sistema Xc^- no transporte de glutamato em células de glioma.
- ✓ Determinar o efeito da CDDP e da inibição do sistema Xc^- nos níveis intracelulares totais de glutatona na linhagem de glioma humano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURAS CELULARES

3.1.1 Cultura celular da linhagem de glioma humano A172

As células A172 foram cultivadas em meio de cultura DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's and nutrient mixture F12* – Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab) em garrafas de cultura de 25cm², à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA, 0,05%; Gibco), plaqueadas assim que atingiram confluência em placas de 24 poços (3,5 x 10⁵) ou placas de 96 poços (0,5 x 10⁵) para análises bioquímicas.

3.1.2 Cultura primária de astrócitos corticais de ratos

Como descrito por Mendes-de-Aguiar e colaboradores (2008), após a decapitação dos ratos Wistar neonatos (0-3 dias) o córtex foi removido e foram retiradas as meninges. O tecido foi dissociado em salina tamponada por fosfato (PBS) suplementada com glicose (0,6%), centrifugado e plaqueado em placas de 24 poços (3,5 x 10⁵) em DMEM-F12 com 10% de SFB. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana. As análises bioquímicas foram realizadas cerca de 10 dias após o início das culturas, que foram mantidas à 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂.

3.2 TRATAMENTO CELULAR

As células da linhagem de glioma humano A172 e/ou os astrócitos corticais foram plaqueados em placas de 24 ou 96 poços. Após confluência, ou atingido o tempo de cultura no caso dos astrócitos, as células foram tratadas com CDDP (Sigma), Sulfassalazina (SAS; Sigma) 300 µM. As análises bioquímicas foram realizadas após 24 horas de tratamento.

3.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CDDP SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

A avaliação do potencial citotóxico da CDDP e sua capacidade em alterar a viabilidade em células A172 e astrócitos corticais, foi realizada através do ensaio de MTT. O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson e Fowler, 1999). Após confluência, foram realizadas curvas de concentração da CDDP e sulfassalazina (inibidor do trocador cistina-glutamato, SAS), para escolha de concentrações não-citotóxicas, possíveis para estudos de transporte (CDDP 10, 50, 100, 200, 300, 500 e 1000 μM ; SAS 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μM). As células foram incubadas com as drogas por 24 horas. Então o meio foi removido e substituído por uma solução 0,2mg/ml de MTT em PBS por duas horas a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, o MTT foi removido e os cristais de formazam reduzido foram solubilizados pela adição de dimetil-sufoxido (DMSO). A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância, medida em leitor de Elisa a 550nm. Os resultados foram expressos considerando-se o grupo controle como 100%.

3.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA CDDP NO TRANSPORTE GLUTAMATÉRGICO

Para avaliação do efeito da CDDP no transporte glutamatérgico foram realizados ensaios de captação e liberação de glutamato em células A172 e astrócitos tratados por 24 horas com o quimioterápico (50 e 100 μM).

3.4.1 Captação de glutamato em células de glioma humano A172 e astrócitos corticais

O ensaio de captação de glutamato foi realizado como descrito por Molz e colaboradores (2009). Após o tratamento, o meio foi descartado e as células foram incubadas com solução salina de Hanks (HBSS – composição em mM: 1.3 CaCl_2 , 137 NaCl , 5 KCl , 0.65 MgSO_4 , 0.3 Na_2HPO_4 , 1.1 KH_2PO_4 , 2 glicose e 5 HEPES.) (pH 7,2). Após 15 minutos foi adicionado 0,33 $\mu\text{Ci/ml}$ de L-[^3H]glutamato com L-glutamato sem marcação para atingir a concentração final de 100 μM . A reação foi interrompida após 7 minutos com duas lavagens de 1 mL de HBSS gelado, seguido por lise celular através da solução composta

de NaOH(0,1 N)/SDS (0,01%) *overnight*. Foram retiradas alíquotas para determinação do conteúdo intracelular de L-[³H]glutamato através do contador de cintilação líquida. Para determinação da captação de glutamato independente de Na⁺ foi utilizado tampão HBSS com adição de cloreto de colina, substituindo o cloreto de sódio. A captação inespecífica independente de sódio foi subtraída da captação total para obtenção da captação de glutamato sódio-depedente. Os resultados foram expressos em nmol de L-[³H]glutamato e normalizados por miligrama de proteína por minuto.

3.4.2.1 Dosagem de proteína para captação de glutamato

O conteúdo proteico das células foi avaliado através do método de Lowry e colaboradores (1951). Albumina bovina sérica (Sigma) foi utilizada como padrão.

3.4.2 Análise da liberação de glutamato em células A172 e astrócitos corticais

Para avaliar as possíveis alterações causadas pela CDDP na liberação de glutamato e o envolvimento do trocador cistina glutamato nesse evento, após o tratamento com CDDP e/ou SAS o meio foi removido e as células incubadas com HBSS por 15 minutos. Após isso, foi adicionado 0,33 µCi/ml de D-[³H]aspartato – análogo do glutamato não metabolizado pelas células, obtendo-se concentração final de 100 µM, por 7 minutos. Então, foram realizados três banhos com HBSS gelado, para retirada do excesso de D-[³H]aspartato livre e as células foram novamente incubadas por 15 minutos em HBSS. Após esse período o meio foi coletado para mensurar a quantidade de D-[³H]aspartato liberado. As células foram lisadas em solução de 0,1 N NaOH/ 0,01% SDS *overnight*. A determinação do conteúdo intracelular e extracelular de D-[³H]aspartato foi avaliada em um contador de cintilação líquida e a porcentagem de aspartato liberado foi expresso em relação a quantidade total de D-[³H]aspartato.

3.4.3 Análise do efeito da CDDP sobre expressão dos transportadores de glutamato EAAT-2 e sistema X^{c-}

Para avaliar o efeito da CDDP na expressão de proteínas relacionadas ao transporte glutamatérgico em células de glioma humano A172, foi realizada a imunodeteção de proteínas por Western Blot e iniciados estudos preliminares de localização através de imunocitoquímica em microscopia confocal.

3.4.3.1 Imunodeteção de proteínas

3.4.3.1.1 Preparação da amostras

Após o tratamento, as células foram lavadas em PBS e solubilizadas em tampão de lise contendo Tris 10 mM pH 6,7, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 2 mM e β -mercaptoetanol 2 mM, em gelo.

3.4.3.1.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada por método de Peterson (1977). Albumina bovina sérica (Sigma) foi utilizada como padrão.

3.4.3.1.3 Separação de proteínas

As proteínas (100 μ g/poço) foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS), utilizando gel de separação de poliacrilamida com concentração de 12%, e gel de entrada 4% (Bunn et al., 1995). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 140 mV (para 2 géis) durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

3.4.3.1.4 Eletrotransferência e imunodeteção

As proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45 μ m) (1,5 horas a 4°C, 350 mA). Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 1 h com albumina 2% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) e a seguir lavadas com TBS-T (Tween-20 0,05 %, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Finalmente as membranas foram incubadas com os anticorpos

específicos anti-EAAT-2 (Millipore, diluição 1:1000), anti-xCT (Abcam, diluição 1:1000) e anti-actina (*Cell Signalling*, diluição 1:1000). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário correspondente ligado à peroxidase (diluição 1:5000) e após lavagens, foram reveladas em filme autoradiográfico após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose (Kit ECL), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4.3.2 Imunocitoquímica

As células de glioma humano A172 foram cultivadas em lamínulas até a confluência e então tratadas com CDDP. Após 24 horas, foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo policlonal anti-EAAT-2 (Millipore) *overnight* (1:2000 a 4°C). Após esse período foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-guinea pig conjugado à peroxidase (1:1000 a 37°C; Millipore). A reação foi revelada pela amplificação de sinal de tiramida (TSA; Perkin-Elmer, Norwalk, CT), seguindo as recomendações do fabricante. A solução foi retirada, as lamínulas colocadas sobre lâminas de vidro para microscopia e então examinadas em microscópio confocal (Leica).

3.5 ANÁLISE DO EFEITO DA CDDP SOBRE DEFESAS ANTIOXIDANTES

3.5.1 Dosagem dos níveis intracelulares de glutathiona (GSH) em células A172

Para investigar o potencial da CDDP em alterar os níveis intracelulares de glutathiona (GSH) as células foram homogeneizadas em ácido perclórico (PCA) 0,5 M, centrifugadas a 15.000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado. As quantidades de glutathiona total foram avaliadas pelo método de Tieze modificado por Akerboom e Sies (1981). Esse método é baseado na reação espontânea do ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) com GSH, gerando ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico (TNB) e um complexo GS-TNB. Este, por sua vez, é reduzido novamente à GSH pela enzima glutathiona redutase usando NADPH, liberando TNB. A velocidade de formação do TNB foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 340 nm por dois minutos e comparada a uma curva padrão.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls. Os dados foram expressos como a média e desvio padrão. Foi utilizado o *software GraphPad Prism 4.0* e valores com $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 CDDP apresenta citotoxicidade em astrócitos corticais em baixas concentrações, mas não altera a viabilidade em células de glioma humano A172

Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade da CDDP em células A172 tratadas por 24 horas, com diferentes concentrações (10 a 1000 μM) (Figura 1). Concentrações até 300 μM não induziram diminuição significativa na viabilidade celular em 24 horas. Já as concentrações de 500 e 1000 μM provocaram perda da viabilidade em células de glioma A172, sendo que na concentração de 1000 μM diminuição da viabilidade celular foi mais expressiva.

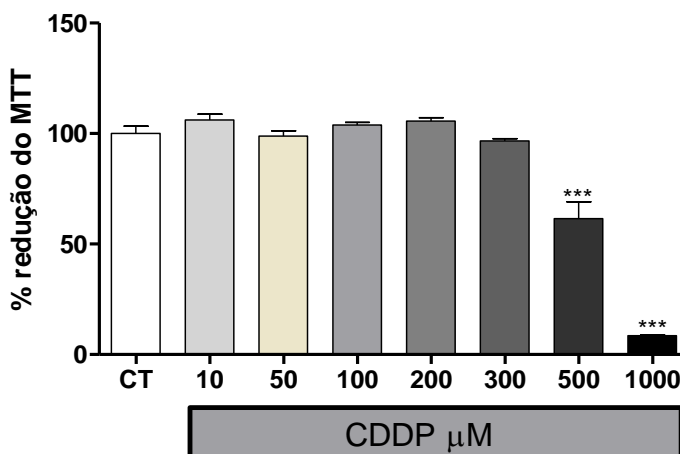


Figura 1: Baixas concentrações de CDDP não alteram a viabilidade de células de glioma humano A172. Após atingirem confluência, as células A172 foram tratadas com concentrações crescentes de CDDP, de 10 a 1000 μM , e após 24 horas foi realizado o ensaio de MTT. Os controles foram incubados com meio de cultura pelo mesmo período do tratamento. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Com o intuito de verificar a citotoxicidade do tratamento com CDDP em células não tumorais, foram utilizadas culturas de astrócitos corticais de ratos neonatos como parâmetro. As concentrações de 50 e 100 μM , que não acarretaram em perda da viabilidade celular em células A172, foram capazes de diminuir a viabilidade em astrócitos corticais de ratos neonatos, quando comparadas ao grupo controle (Figura 2A). A figura 2B demonstra a ausência de alterações na viabilidade em células A172 testadas com as mesmas concentrações. Dessa forma, para as análises seguintes, foram escolhidas as concentrações de 50 e 100 μM de CDDP, por demonstrarem um comportamento resistente das células de glioma humano A172 à CDDP.

4.2 Células de glioma humano A172 apresentam diminuição na captação de glutamato e aumento da liberação de glutamato quando comparadas a astrócitos corticais de ratos neonatos

Dados da literatura demonstram que as células de glioma apresentam alterações no sistema glutamatérgico (Groot e Sontheimer, 2011). Quando comparadas a astrócitos normais, as células de glioma apresentam redução na captação de glutamato, sendo que os níveis de glutamato captado podem ser até dez vezes menores quando comparados a astrócitos normais (Ye e Sontheimer, 1999).

Além disso, células de glioma humano em cultura, podem aumentar a liberação de glutamato, elevando em até três vezes os níveis extracelulares de glutamato em um período de 12 horas (Ye e Sontheimer, 1999; Ye et al., 1999). Assim sendo, foi realizada uma comparação entre os níveis de glutamato captado e liberado por astrócitos e células A172 não tratadas. Os resultados demonstraram que a linhagem celular A172 apresenta uma redução da captação de glutamato quando comparadas aos astrócitos corticais normais (Figura 3A). Alterações nos níveis de liberação de glutamato também foram observadas. Observou-se um aumento de aproximadamente de três vezes nos níveis de glutamato liberado por células A172 não tratadas quando comparadas com astrócitos (Figura 3B).

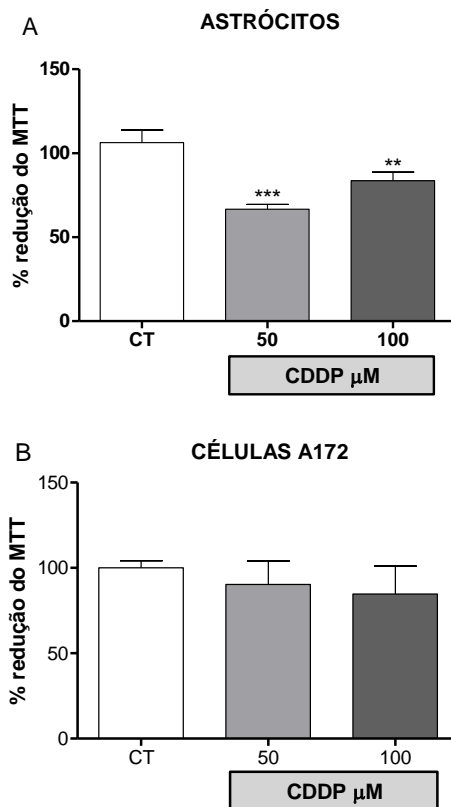


Figura 2. Baixas concentrações de CDDP reduzem a viabilidade em astrócitos corticais, mas não exercem esse efeito na viabilidade de células de glioma humano. As células foram tratadas com CDDP, 50 e 100 μM , por 24 horas então foi realizado o método de redução do MTT. Os controles foram incubados com meio de cultura pelo mesmo período. (A) Astrócitos corticais (B) Células da linhagem A172. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de cinco experimentos distintos para A e oito para B. Valores expressos em porcentagem do controle. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

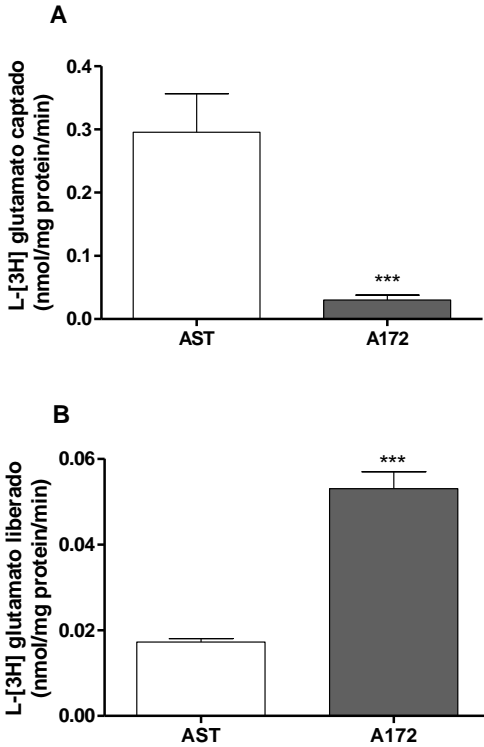


Figura 3. Células de glioma humano A172 não tratadas apresentam diminuição na captação de glutamato e aumento na liberação de glutamato quando comparadas a astrócitos corticais primários não tratados. (A) Medida de captação de glutamato em células de glioma humano A172 e em cultura de astrócitos neonatos. A captação de L-[³H]glutamato foi avaliada após 7 minutos de incubação. A radioatividade foi avaliada em um contador para cintilação líquida e os resultados foram expressos em nmol de L-[³H]glutamato por miligrama de proteína por minuto. (B). Medida de liberação de glutamato em células de glioma humano A172 e cultura de astrócitos neonatos. A liberação foi avaliada após incubação com D-[³H]aspartato, medido no sobrenadante por cintilação líquida. AST – astrócitos corticais de ratos neonatos. Os resultados indicam a média \pm o desvio padrão de oito experimentos independentes em (A) e (B) separadamente. *** $p < 0,0001$ (teste t).

4.3 O tratamento com CDDP altera o transporte de glutamato em astrócitos corticais e em células de glioma humano A172

Para avaliar o efeito do tratamento com CDDP no transporte glutamatérgico, os astrócitos e células A172 foram tratados com CDDP 50 e 100 μM durante 24 horas.

Os resultados apresentados aqui demonstram que tanto em astrócitos quanto em células de glioma humano A172, o tratamento com o quimioterápico foi capaz de diminuir a captação de glutamato na concentração de 100 μM , quando comparados ao respectivo grupo controle (Figuras 4). Por outro lado, a concentração de 50 μM foi capaz de exercer esse efeito na captação de glutamato somente nas células de glioma A172 (Figura 4B).

Levando em consideração as alterações observadas na captação de glutamato devido ao tratamento com CDDP e que células de glioma apresentam aumento nos níveis de glutamato liberado, nós objetivamos avaliar o efeito do quimioterápico na liberação de glutamato. Em cultura de astrócitos observou-se um aumento na liberação de glutamato, em ambas as concentrações testadas de CDDP (50 e 100 μM) (Figura 5A). Da mesma maneira, em células de glioma humano A172, a CDDP foi capaz de aumentar a liberação de glutamato tanto em 50 μM quanto em 100 μM (Figura 5B).

Dadas às observações que demonstraram que a CDDP modula o transporte de glutamato e as células de glioma apresentam resistência à CDDP, a partir deste momento passamos a analisar o efeito da CDDP somente em células de glioma A172. Assim sendo, visamos analisar se o efeito da CDDP na modulação do transporte está relacionado com a expressão do transportador dependente de sódio EAAT2. Verificamos que o tratamento com CDDP (50 e 100 μM) não foi capaz de alterar os níveis de expressão desse transportador em células de glioma humano (Figuras 6A e 6B).

Análises preliminares de imunocitoquímica das células A172 marcadas com anticorpo anti-EAAT2, demonstraram uma aparente diminuição da expressão desse transportador na membrana celular, comparando astrócitos saudáveis com células de glioma A172. Além disso, houve diminuição da marcação em células tratadas com CDDP 50 e 100 μM em comparação com seu controle da respectiva linhagem, bem como em comparação com astrócitos corticais de ratos neonatos (Figura 7).

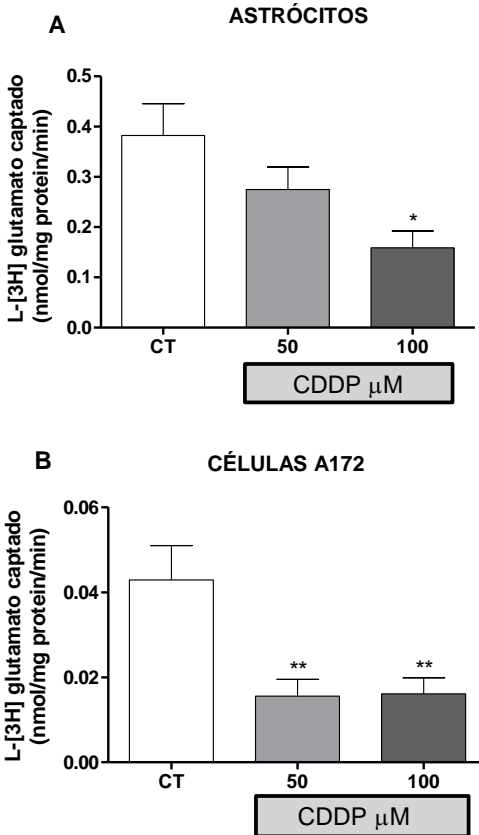


Figura 4. CDDP é capaz de diminuir a captação de glutamato em células de glioma humano A172 e em astrócitos corticais. (A) Após a confluência as culturas de astrócitos corticais de ratos neonatos foram tratadas com CDDP 50 e 100 μM por 24 horas. (B) Culturas de glioma humano A172 foram tratadas com CDDP 50 e 100 μM por 24 horas. Após esse período, as células foram submetidas ao ensaio de captação de glutamato. A radioatividade foi avaliada em um contador para cintilação líquida e os resultados foram expressos em nmol de L - [^3H]glutamato por miligrama de proteína por minuto. Os dados expressam a média \pm o desvio padrão de seis experimentos independentes em (A) e (B). (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

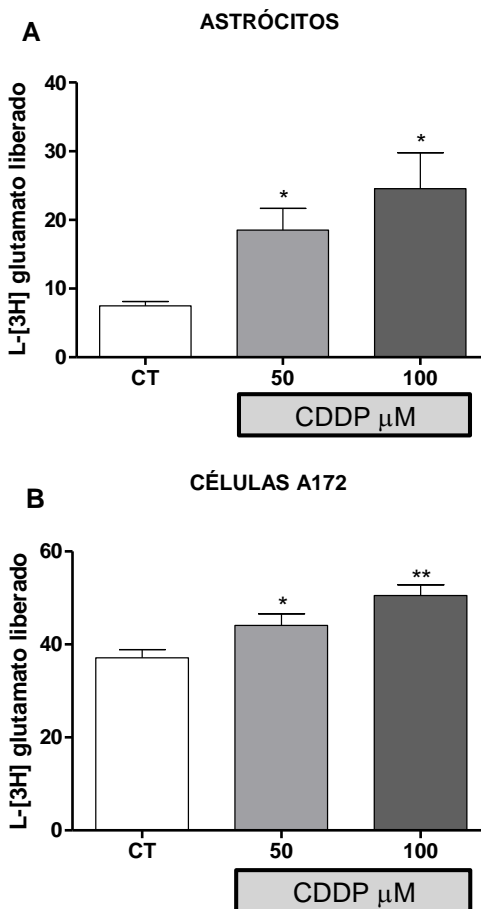


Figura 5. CDDP aumentou a liberação de glutamato em astrócitos corticais e células A172. As células foram tratadas com CDDP 50 e 100 μM , por 24 horas. (A) Astrócitos tratados com CDDP apresentaram aumento na liberação de glutamato em ambas às concentrações testadas similarmente. (B) Ainda, a CDDP acarretou em aumento na liberação de glutamato em células de glioma humano A172. Dados expressos como porcentagem das médias \pm desvio padrão de seis experimentos independentes em (A) e (B) separadamente. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls)

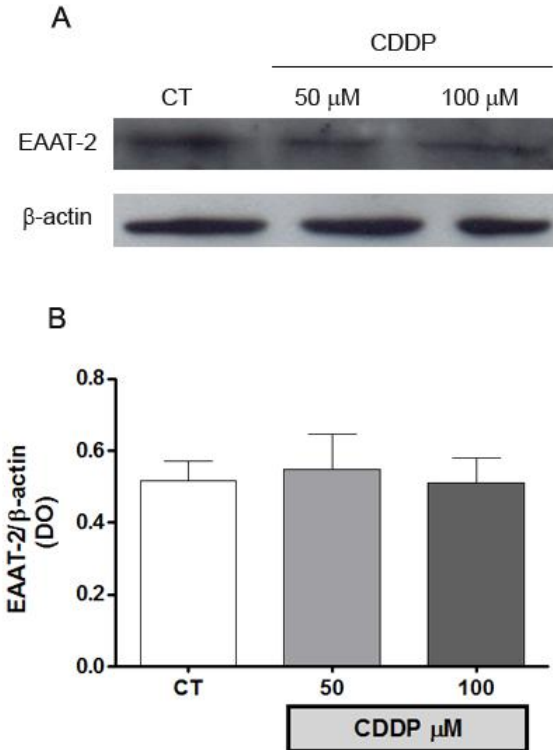


Figura 6. O tratamento com CDDP não altera a expressão do transportador de glutamato dependente de sódio-EAAT-2 em células de glioma A172. Após o tratamento CDDP (50 e 100 μ M) por 24 horas, foram extraídas as proteínas das culturas de glioma A172 e analisadas por Western Blot. (A) Imunoblotting representativo da imunomarcação de EAAT-2 e β -actina. (B) Quantificação da razão entre a imunomarcação de EAAT2/ β -actina. A densidade óptica das bandas foi mensurada pelo software Scion Image. Dados foram normalizados pelos níveis de expressão de β -actina. Resultados indicam a média \pm o desvio padrão de seis experimentos independentes. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

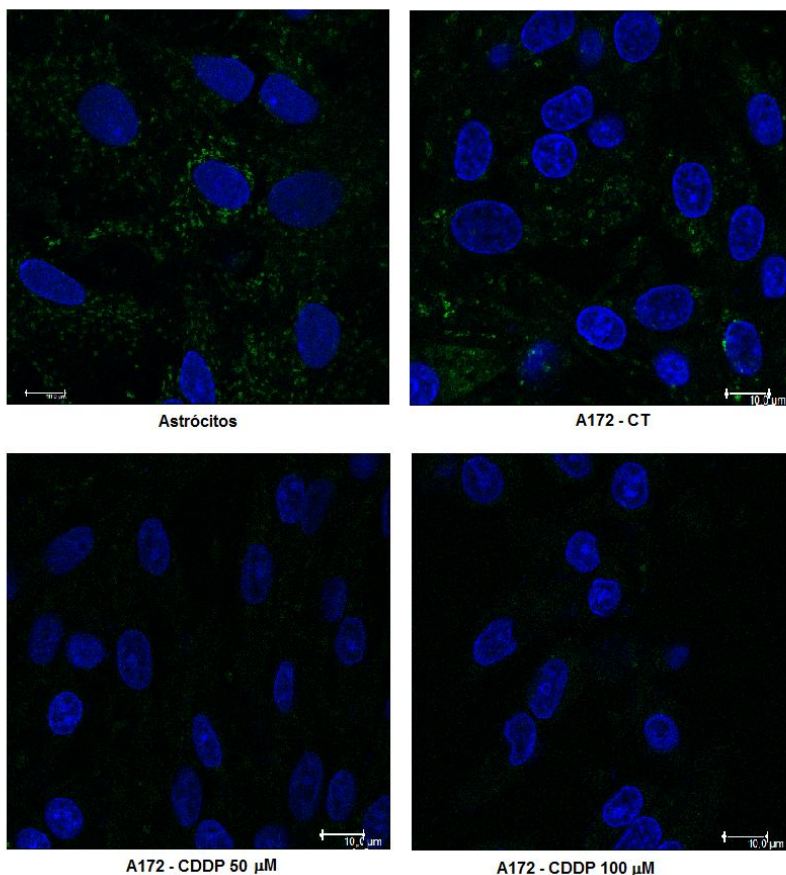


Figura 7. Imunocitoquímica com marcação para EAAT-2 em astrócitos não tratados e células de glioma A172 tratadas com CDDP. Após atingir confluência, as células foram tratadas com 50 e 100 μM de CDDP durante 24 horas. Astrócitos e A172 controle foram mantidas a meio não suplementado com SFB no período do tratamento. A imunofluorescência para EAAT-2 foi realizada como descrição do Material e Métodos. As células de glioma humano A172 apresentaram uma diminuição na marcação para EAAT-2 na membrana citoplasmática, em comparação com astrócitos corticais. O tratamento com CDDP, em ambas as concentrações, acarretou em redução da marcação para o transportador na membrana, tanto com comparação ao grupo controle, quanto em comparação a astrócitos não tratados. A

marcação de núcleo celular foi realizada com Hoescht. (N=1). Escala da barra – 10 μm .

Considerando-se que, em gliomas, uma substancial porção do glutamato liberado ocorre pela ativação do trocador cistina-glutamato (sistema Xc) (Sontheimer, 2008) e ainda, o tratamento com CDDP foi capaz de aumentar a liberação de glutamato em células de glioma, foi avaliado o efeito do tratamento com CDDP na expressão do sistema Xc. O tratamento com CDDP (50 e 100 μM) não promoveu alterações na expressão do xCT (subunidade catalítica do sistema Xc) em células de glioma humano (Figura 8).

4.4 O tratamento com CDDP não altera os níveis totais de glutathiona entretanto a inibição do sistema Xc⁻ reduz significativamente nos níveis de GSH em células de glioma humano A172

Buscando investigar o envolvimento da CDDP e do sistema Xc⁻ nas defesas antioxidantes em células de glioma, foram avaliados os níveis totais de glutathiona em células A172 tratadas com CDDP e Sulfasalazina (SAS, 300 μM – inibidor do sistema Xc). As concentrações testadas de CDDP (50 e 100 μM) *per se* não apresentaram alterações nos níveis de GSH, quando comparadas ao grupo controle. Entretanto, as células A172 incubadas com SAS sozinha, ou co-incubadas com CDDP, apresentaram uma impotente diminuição nos níveis de GSH, chegando aproximadamente a 70% de redução quando comparadas ao grupo controle (Figura 9).

4.5 A inibição do sistema Xc⁻ previne o aumento na liberação de glutamato causada pela CDDP, mas não causa alterações na viabilidade celular em células de glioma humano A172

No intuito de avaliar a participação do sistema Xc⁻ no aumento da liberação de glutamato acarretado pela CDDP foi utilizada a SAS (inibidor do sistema Xc) e mensurada a liberação de glutamato. As células de glioma humano A172 foram tratadas com CDDP (50 e 100 μM) e co-incubadas com SAS (300 μM). Como descrito previamente, CDDP sozinha aumentou a liberação de glutamato. A presença da SAS, previniu o aumento na liberação de glutamato promovido pela CDDP, mantendo a liberação nos níveis do grupo controle (Figura 10).

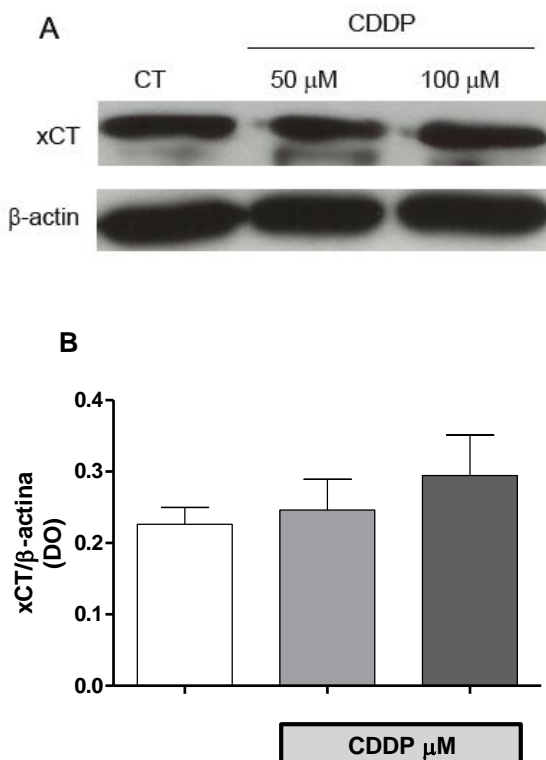


Figura 8. CDDP não causou alteração na expressão do sistema Xc^- em células de glioma humano A172. Após confluência, as células foram tratadas com CDDP (50 e 100 μ M), por 24 horas. Então foram extraídas as proteínas e analisadas por Western Blot. Ainda que a CDDP tenha elevado a liberação de glutamato, não foram observadas alterações de expressão do xCT, em culturas de glioma humano, em nenhuma das concentrações testadas. Dados foram normalizados pelos níveis de expressão de β -actina. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

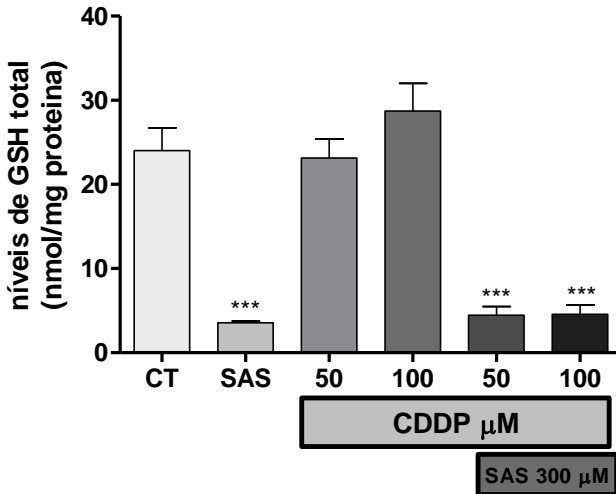


Figura 9. Os níveis de glutationa total não sofreram alteração com tratamento com CDDP em células de glioma A172 embora a inibição do sistema Xc^- tenha diminuído os níveis de glutaciona. Após confluência, as células foram incubadas com CDDP (50 e 100 μM) e SAS (300 μM), ou coincubadas com as duas drogas em suas respectivas concentrações. Após um período de 24 horas foram analisados os níveis de glutaciona total. CDDP *per se* não foi capaz de alterar os níveis de glutaciona. Entretanto, a presença da SAS diminuiu criticamente os níveis de glutaciona. Dados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. *** $p < 0,001$ representa diferença significativa em comparação ao grupo controle. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

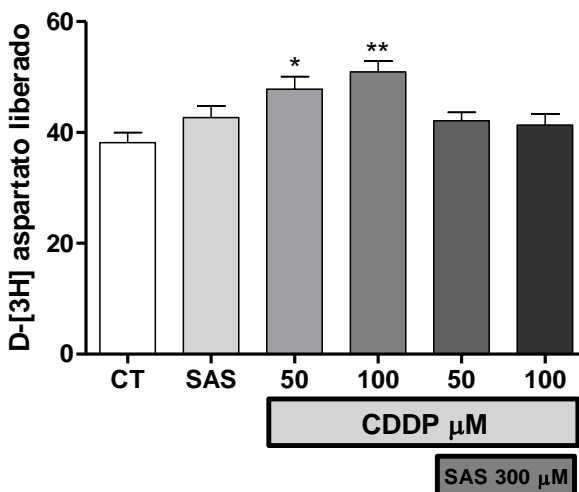


Figura 10. A inibição do sistema Xc^- previniu o aumento na liberação de glutamato causada pela CDDP em células de glioma humano A172. As células foram tratadas com CDDP (50 e 100 μM), SAS (300 μM) ou coincubadas com as duas drogas por 24 horas, então foi realizada um análise da liberação de glutamato. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ com diferença relativa ao grupo controle. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Como o tratamento com SAS diminui os níveis de GSH, uma importante defesa antioxidante, avaliamos se o tratamento com SAS e sua co-incubação com CDDP exercem algum efeito sobre a viabilidade celular das células de glioma. O tratamento com SAS ou a co-incubação de CDDP e SAS não alterou a viabilidade celular em A172, após 24 horas de tratamento (Figura 11).

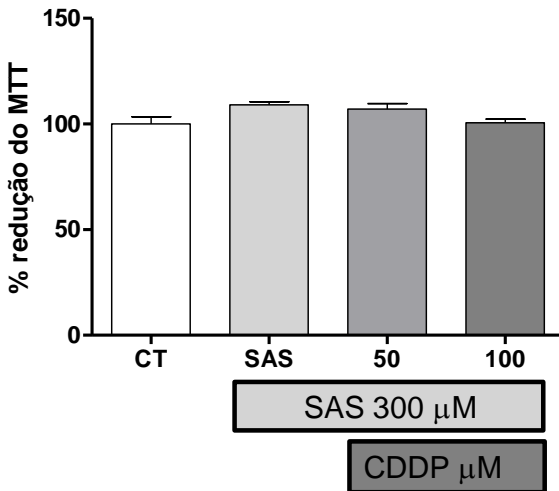


Figura 11. A inibição do sistema Xc^- não altera a viabilidade celular em células de glioma humano A172. As células foram tratadas com CDDP (50 e 100 μM), SAS (300 μM) ou co-incubadas com ambas as drogas, após 24 horas foi realizado o ensaio de redução do MTT. Resultados normalizados em função do controle como 100%. Dados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos distintos. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls).

5 DISCUSSÃO

Desde o início dos testes clínicos com CDDP, esta foi de grande impacto no tratamento do câncer, auxiliando na terapia de diversos tipos de tumores (Prestayko et al., 1979). Ao longo de 30 anos foram reconhecidos os benefícios de sua utilização. Entretanto, para aprimorar abordagens terapêuticas e elucidar todos os seus efeitos, ainda é necessária maior compreensão a respeito de seus mecanismos de ação (Siddik, 2003).

Os dados deste trabalho sugerem que as menores concentrações testadas de CDDP, por 24 horas, em células de glioma humano A172 são inefetivas em causar alterações na viabilidade celular. Para tanto é necessária a aplicação de concentrações elevadas, entre 500 e 1000 μM (Figura 1), pelo mesmo período, para que ocorra diminuição significativa na viabilidade celular. Já astrócitos corticais de ratos neonatos foram mais sensíveis à exposição ao quimioterápico acima citado. Concentrações inefetivas em causar alteração na viabilidade das células de glioma (50 e 100 μM) foram capazes de reduzir a viabilidade dos astrócitos (Figura 2A). A sensibilidade de astrócitos primários à CDDP já é bastante conhecida. CDDP 48 μM , durante 72 horas, é capaz de diminuir a sobrevivência celular de astrócitos em 50% (Wicks et al., 2004). Ashby e Shapiro (2001), descreveram a ocorrência de sepse, falha renal, mielossupressão, anemia e neutropenia, em estudo clínico de fase II para o tratamento de gliomas, utilizando CDDP intra-arterial concomitantemente com o tratamento via oral de etoposídeo (inibidor da topoisomerase II), não recomendando mais estudos clínicos com CDDP por essa via. Dessa maneira, nossos resultados corroboram com a citotoxicidade já conhecida da CDDP a células saudáveis. Tal toxicidade dificulta o uso da CDDP pelo alto potencial neurotóxico e dano sistêmico ocasionados em pacientes tratados com esta droga (Huo et al., 2012).

A ausência de alterações na viabilidade de células de glioma A172, em concentrações capazes de diminuir a viabilidade em astrócitos saudáveis (Figura 2B), pode estar relacionada a mecanismos de resistência que as células de glioma podem apresentar à CDDP. Os mecanismos de resistência a quimioterápicos estão relacionados a eventos de exposição crônica à droga ou mecanismos intrínsecos, causando falha na ativação do processo de apoptose (Oren et al., 2002; Siddik, 2003). Nesse aspecto, a ocorrência de resistência a quimioterápicos é a principal razão de falha na cura de pacientes com gliomas, que apresentam altas taxas

de desenvolvimento *de novo*, bem como resistência adquirida com crescimento final letal do tumor (Desjardins et al., 2005).

Estudos sugerem que a resistência à CDDP é multifatorial. Fatores como a melhora no reparo do DNA, presença de proteínas de resistência à múltiplas drogas, aumento do efluxo de fármacos, redução da captação de drogas, alta ativação da γ -glutamylcisteína sintetase e a consequente elevação nos níveis de glutatona, aumento da ativação da via PI3K-AKT são mecanismos possivelmente associados à esta resistência (Andrews et al., 1988; Mistry et al., 1991; Kelland, 1993; Bible et al., 2000; Siddik, 2003).

Além dos mecanismos de resistência a fármacos citados acima, existem eventos de resistência próprios do desenvolvimento do câncer. Entre estes eventos em células de glioma, estão as alterações apresentadas no funcionamento do sistema glutamatérgico (Lyons et al., 2007). A comparação entre a captação de glutamato Na^+ -dependente realizado pelos astrócitos normais e pelas células malignas demonstra uma evidente diminuição nos níveis de glutamato captado por células de glioma. Simultaneamente, a análise dos níveis de glutamato extracelular demonstra que células de glioma liberam quantidades elevadas deste neurotransmissor para o espaço extracelular (Groot e Sontheimer, 2011).

Uma consequência evidente do estabelecimento de células de glioma é a morte neuronal peritumoral por excitotoxicidade glutamatérgica (Ye e Sontheimer, 1999). Esse fenômeno é acarretado pela elevação nos níveis do neurotransmissor na fenda sináptica. Existem evidências que sugerem que o glutamato liberado por células de glioma é produto da ativação do sistema Xc^- , responsável pela captação de cistina pela célula, liberando em contrapartida glutamato para o meio extracelular. Ye e Sontheimer (1999) demonstraram que astrócitos são capazes de diminuir os níveis de glutamato no meio de cultura, de aproximadamente 90 μM para 1 μM , em um período de 3h, já células de glioma não captam o glutamato do meio e ainda triplicam sua concentração em um período de 12h. Esse mesmo estudo ainda constata que co-cultura de neurônios e células de glioma, estas provocam influxo massivo de íons cálcio nos neurônios, levando-os à morte. Além disto, foi demonstrado que a inibição do receptor AMPA e do sistema Xc^- previnem a morte neuronal (Lyons et al., 2007).

Mesmo astrócitos sendo mais tolerantes a concentrações elevadas de glutamato, estas células sadias podem sofrer danos celulares decorrentes dos altos níveis de glutamato liberados pelo glioma. Além disso, os astrócitos podem perder a capacidade de captar o glutamato ou

ainda a função de catabolizar glutamato a glutamina (Groot e Sontheimer, 2011).

Apesar de estudos sugerirem que a origem das células de glioma seja precursores astrocíticos (Ohgaki e Kleihues, 2009), astrócitos e células de glioma apresentam diversas singularidades. Algumas dessas alterações acarretam em modificações importantes de função, por exemplo, a manutenção da homeostase glutamatérgica. Análises de expressão de transportadores dependentes de Na^+ em biópsias de pacientes, demonstrou alteração significativa da expressão de EAAT-1 e EAAT-2 (Ye et al., 1999). Um estudo comparativo entre células de glioma e astrócitos corticais demonstrou que o transportador de glutamato EAAT-1 tem perda da sua expressão na membrana celular. Além disso, EAAT-2 apresenta sua expressão reduzida. Estas transformações são capazes de causar um desbalanço nos níveis de glutamato extracelular (Ye et al., 1999). Assim sendo, em nosso estudo foi realizada uma comparação entre o transporte glutamatérgico em astrócitos corticais e células de glioma humano A172 (Figura 3). Observamos uma evidente diminuição na captação de glutamato em células de glioma, quando comparado a astrócitos corticais (Figura 3A). A análise comparativa da liberação de glutamato demonstrou que células de glioma humano A172 liberam cerca de três vezes mais glutamato do que astrócitos primários (Figura 3B), corroborando com os dados da literatura.

Além da comparação realizada entre astrócitos e células de glioma, buscamos estudar o efeito da CDDP na captação de glutamato nas células citadas, separadamente. O tratamento com CDDP 100 μM foi capaz de reduzir os níveis da captação de glutamato cerca de 45%, em astrócitos (Figura 4A). Apesar de haver alteração na viabilidade celular tanto em 50 μM quanto em 100 μM , a menor concentração não causou alteração na captação de glutamato. Em contrapartida, na linhagem de glioma humano, CDDP causou diminuição na captação de glutamato em ambas as concentrações testadas (50 e 100 μM) em torno de 45% (Figura 4B). Tais resultados sugerem que as células A172 são mais suscetíveis às alterações ocasionadas pela CDDP que astrócitos normais na captação de glutamato. Estas observações reforçam as alterações intrínsecas que ocorrem no sistema de transporte glutamatérgico em células de glioma (Ye et al., 1999). Ainda, as alterações observadas neste trabalho indicam a importância da modulação do sistema glutamatérgico como mecanismo de resistência em células de glioma tratadas com CDDP.

A capacidade da CDDP em exercer alterações na expressão de proteínas já é bem descrito em diversos tipos celulares (Bible et al., 2000; Siddik, 2003; Wicks et al., 2004). Em nosso estudo, avaliamos o efeito da CDDP na expressão do transportador de glutamato EAAT-2. CDDP nas concentrações testadas (50 e 100 μM), não exerceu alteração nos níveis de expressão do EAAT-2 nas células A172 (Figura. 6 A e B). Porém, nossos estudos preliminares de localização, em microscopia confocal, sugerem que além de as células de glioma humano A172 apresentarem diminuição da expressão de EAAT-2 quando comparadas com astrócitos, o tratamento com CDDP exibiu aparente capacidade em alterar a localização desses transportadores na membrana celular (Figura 7). Assim sendo, sugerimos que a CDDP é capaz de modular a captação de glutamato através da influência sobre a localização e atividade desse transportador.

No tocante à liberação de glutamato, estudos apontam que gliomas apresentam altos níveis de glutamato extracelular, sendo que esse fenômeno é capaz de tornar o microambiente excitotóxico para neurônios (Ye e Sonheimer, 1999). O aumento na liberação de glutamato acarreta em oscilações nos níveis de Ca^{2+} intracelular em células de glioma e auxilia no estímulo à migração celular (Lyons et al., 2007). Visto que os níveis de glutamato liberados por gliomas é alto, estes são capazes de acarretar crises epiléticas em modelo animal (Buckinham et al., 2011). Por conseguinte, buscamos observar o potencial da CDDP em modular a liberação de glutamato. Nossos dados indicam que esse quimioterápico é capaz de exercer alteração na liberação de glutamato tanto em astrócitos corticais normais, quanto na linhagem de glioma humano (Figuras 5A e B). As duas concentrações testadas (50 e 100 μM) foram capazes de aumentar os níveis de liberação de glutamato de maneira significativa. Esses dados demonstram que a CDDP também mostra-se capaz de modular a liberação de glutamato.

Estudos têm demonstrado que linhagens celulares de gliomas e ainda biópsias humanas apresentam elevada expressão do sistema Xc^- (Groot e Sonheimer, 2011). Essa alteração está diretamente relacionada ao aumento do glutamato liberado, neurodegeneração e formação de edema cerebral em casos de gliomas não tratados (Lyons et al., 2007; Savascan et al., 2008). Em nosso trabalho, células A172 não apresentaram aumento na expressão da subunidade catalítica (xCT) do sistema Xc^- , após o tratamento com CDDP (Figura 8). Dessa maneira, nossos dados indicam que esse composto é capaz de modular a atividade do sistema Xc^- , aumentando os níveis de glutamato extracelular. Assim,

podemos sugerir que este evento contribui para a morte celular do tecido peritumoral.

O conjunto de dados das alterações na captação e na liberação de glutamato implicados pelo tratamento com CDDP, tanto em astrócitos corticais de ratos quanto na linhagem tumoral A172, apontam para uma modulação direta do composto CDDP na atividade de transportadores de glutamato. Células tumorais têm sua obtenção de ATP predominantemente via glicólise, mesmo durante condições aeróbicas, sendo que ocorre um aumento na captação da glicose para manutenção dos níveis de produção de ATP (Kim e Dang, 2006). Intermediários da via glicolítica são utilizados pelas células de câncer para reações anabólicas, sem as quais a rápida proliferação não seria possível. O aumento das atividades metabólicas nessas células eleva a produção de ERO, sendo necessárias adaptações para proteger as células do dano oxidativo (Halliwell, 2007). Nesse aspecto, a elevada atividade do sistema Xc^- é capaz de promover aumento nos níveis intracelulares de cistina e consequente produção de GSH, propiciando efeito protetor contra estresse oxidativo em células de gliomas (Groot e Sontheimer, 2011; Ungard e Singh, 2011). Em situação de hipóxia, células de glioma apresentam aumento de ROS e NO, mas seu crescimento não é alterado devido ao aumento da expressão do sistema Xc^- e subsequente produção de GSH. A inibição da síntese de GSH, com uso de butionina sulfoximina (BSO) acarreta em diminuição da proliferação celular em gliomas (Ogunrinu e Sontheimer, 2010).

A exposição crônica de células à CDDP ou ainda, modelos de tumores resistentes, demonstram elevação nos níveis de glutathiona, aumentando as defesas antioxidantes em células tumorais (Kelland, 1993; Siddik, 2003). Esse aumento pode ser diretamente relacionado à capacidade da CDDP em modular a atividade do sistema Xc^- . Em nosso estudo, não foram observadas alterações nos níveis de glutathiona acarretados pelo tratamento com CDDP, na linhagem A172 (Figura 9). Todavia, o mecanismo de ação pelo qual a CDDP interage com o DNA é vulnerável à inativação pela interação com proteínas citoplasmáticas. CDDP é capaz de interagir com diversos componentes intracelulares, incluindo a glutathiona, metionina, metalotionina e outras proteínas (Siddik, 2003). A interação CDDP-glutathiona pode interferir na aferição dos níveis de GSH, tal interação pode justificar a ausência de alteração nos níveis de GSH em células A172 tratadas com CDDP. Entretanto, a inibição do sistema Xc^- , com aplicação de SAS, levou a uma drástica redução nos níveis de GSH, evidenciando que a produção desta pelas células de glioma humanos A172 requer a atividade do sistema Xc^- . Este

resultado corrobora com Chung e colaboradores (2005), que demonstraram que a inibição do sistema Xc^- via (S)-4-carboxifenilglicina ou SAS reduz a captação de cistina e consequentemente os níveis de glutathiona.

Os mesmos pesquisadores acima citados descreveram que a inibição do sistema Xc^- , através do uso da SAS, é capaz de diminuir a liberação de glutamato de maneira dose dependente, em linhagens de glioma humano. Essa inibição é capaz de comprometer a invasão e o crescimento tumoral em modelo de glioma em camundongos (Lyons et al., 2007). O mecanismo pelo qual a inibição do sistema Xc^- é capaz de impedir o crescimento tumoral é diretamente relacionado à inibição da síntese de DNA. O tratamento com SAS causa uma diminuição de células em fase G_2 e aumento em fase S, isso pode ser normalizado pela adição de cistina, quando a célula retoma o ciclo celular normalmente (Chung et al., 2005). Nesse aspecto, em nosso estudo, testamos o efeito da CDDP e da SAS, isoladas ou concomitantes na liberação de glutamato. O aumento na liberação de glutamato, causada pela CDDP nas células de glioma humano A172, foi prevenido pela inibição do sistema Xc^- (Figura 10). Esse resultado demonstra a implicação do sistema Xc^- no aumento da liberação de glutamato causada pela CDDP. Como consequência, CDDP mostrou potencial em aumentar a malignidade das células de glioma, associado ao sistema glutamatérgico, em áreas onde a concentração de CDDP é capaz de modular o sistema Xc^- , podendo aumentar a morte das células não tumorais, por excitotoxicidade glutamatérgica. Quanto à SAS, estudos já citados sugerem que a inibição crônica da captação de cistina, via sistema Xc^- pode causar ativação de morte celular apoptótica, pelo aumento de caspase 3 ativada e pode suprimir o desenvolvimento tumoral em gliomas (Chung et al., 2005). Existem estudos clínicos em andamento, em fase I e II, da eficácia e segurança do uso da SAS como tratamento de gliomas malignos (Robe et al., 2006).

O potencial citotóxico da CDDP já é bem descrito. Esse composto através de entrega lipossomal ou livre, intracerebral, pode acarretar danos severos ao tecido cerebral, como edema, hemorragia e necrose. A distribuição não homogênea desse fármaco na massa tumoral pode causar variabilidade na concentração deste nas células tumorais, podendo engatilhar mecanismos de resistência (Huo et al., 2012). Entretanto, um estudo clínico de fase II, de uso concomitante da CDDP e ACNU (Nimustina) demonstrou resultados positivos, com 53% de pacientes responsivos ao tratamento, apesar de alta presença de

mielossupressão e taxa de sobrevivência média de apenas 17 meses (Gwak et al., 2005).

Nossos resultados sugerem que a CDDP não foi capaz de diminuir a viabilidade celular na linhagem de glioma humano A172, nas menores concentrações testadas. Contudo, essas concentrações foram capazes de modular a captação glutamatérgica e a atividade do sistema Xc^- , aumentando os níveis extracelulares de glutamato. Existem diversos mecanismos de ação já propostos para a CDDP. Tais mecanismos demonstram a presença de toxicidade da CDDP em tecidos normais, bem como ativação de mecanismos de resistência em células de glioma, além da função alquilante de DNA esperada com o uso deste composto. Nosso trabalho corrobora com dados que sugerem que, o uso da CDDP como um composto quimioterapêutico, não deve ser proposto como tratamento de gliomas. O dano causado pelo aumento extracelular de glutamato e a quebra da homeostase glutamatérgica celular, pode ser perigoso para pacientes com glioma tratados com CDDP. Desta maneira, estudos sobre a ação da CDDP nas vias de desenvolvimento de gliomas, bem como as consequências do seu efeito no tecido normal, ainda são necessários.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Altas concentrações de CDDP são capazes de diminuir a viabilidade celular em células de glioma humano A172;
- ✓ CDDP em baixas concentrações não causa alteração na viabilidade celular em células de glioma, entretanto tais concentrações diminuem a viabilidade celular de astrócitos corticais de ratos neonatos, sugerindo que células A172 são menos sensíveis à ação da CDDP;
- ✓ O tratamento com CDDP acarretaem diminuição da captação de glutamato tanto na linhagem de glioma humano A172 quanto em astrócitos corticais primários;
- ✓ CDDP, nas concentrações testadas, não alterou os níveis totais de expressão do transportador de glutamato Na^+ -dependente EAAT-2;
- ✓ CDDP aumentou a liberação de glutamato. O efeito observado pelo tratamento com CDDP na liberação de glutamato foi similar nos dois tipos celulares testados.
- ✓ CDDP não acarretou alterações nos níveis de glutathione em células A172, nas concentrações de 50 e 100 μM , entretanto a inibição do sistema Xc^- , pela SAS, foi capaz de diminuir significativamente os níveis totais de GSH;
- ✓ A inibição do sistema Xc^- , pela SAS, preveniu o aumento na liberação de glutamato acarretada pelo tratamento com CDDP, sem causar alterações na viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

Agnihotri, S.; Gajadhar, A.S.; Ternamian, C.; Gorlia, T.; Diefes, K.L.; Mischel, P.S.; Kelly, J.; McGown, G.; Thorncroft, M.; Carlson, B.L.; Sarkaria, J.N.; Margison, G.P.; Aldape, K.; Howkins, C.; Hegi, M.; Guha, A. Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients **J Clin Invest.** v.122, p.253-266. 2012.

Akerboom, T.P.; Sies, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol.** v.77, p.373-382. 1981.

Allard, E.; Passirani, C.; Benoit, J.P. Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors. **Biomaterials.** v.30, p.2302-2318. 2009.

Andrews, P.A.; Velury, S.; Mann, S.C.; Howell, S.B. cis-Diamminedichloroplatinum (II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. **Cancer Res.** v. 48, p.68-73. 1988.

Ashby, L.S. e Shapiro, W.R. Intra-arterial cisplatin plus oral etoposide for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase II study. **J Neurooncol.** v.51, p.67-86. 2001.

Bannai, S.; Ishii, T. A novel function to glutamine in cell culture: utilization of glutamine for the uptake of cystine in human fibroblasts. **J Cell Physiol.** v.137, p.360-366.

Bible, K.C.; Boerner, S.A.; Kirkland, K.; Anderl, K.L.; Bartelt, D.Jr.; Svinger, P.A.; Kottke, T.J.; Lee, Y.K.; Eckdahl, S.; Stalboerger, P.G.; Jenkins, R.B.; Kaufmann, S.H. Characterization of an ovarian carcinoma cell line resistant to cisplatin and flavopiridol. **Clin. Cancer Res.** v.6, p.661-670. 2000.

Boll, M.C.; Alcaraz-Zubeldia, M.; Rios, C. Medical management of Parkinson's disease: focus on neuroprotection. **Curr Neuropharmacol.** v.9, p.350-359, 2011.

Bunn, S.J.; Sim, A.T.; Herd, L.M.; Austin, L.M.; Dunkley, P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of intracellular Ca²⁺ in the histamine H1 receptor-stimulated phosphorylation of Ser8, Ser19, Ser31, and Ser40. **J Neurochem.** v.64, p.1370-1378, 1995.

Buckingham, S.C.; Campbell, S.L.; Haas, B.R.; Montana, V.; Robel, S.; Ogunrinu, T.; Sontheimer, H. Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. **Nat Med.** v.17, p.1269-1279. 2011.

Camacho, A. e Massieu, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. **Arch Med Res.** v.37, p.11-18. 2006.

Carmignoto, G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons. **Prog. Neurobio.** v.62, p.561-581. 2000.

Carrillo, J.A. e Munoz, C.A. Alternative chemotherapeutic agents: nitrosureas, cisplatin, irinotecan. **Neurosurg Clin N Am.** v.23, p.297-306. 2012.

Cassano, T.; Serviddio, G.; Gaetani, S.; Romano, A.; Dipasquale, P.; Cianci, S.; Bellanti, F.; Laconca, L.; Romano, A.D.; Padalino, I.; Laferla, F.M.; Nicoletti, F.; Cuomo, V.; Vendemiale, G. Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. **Neurobiol Aging.** v.33, p.1112-1121. 2012.

Chung, J W, Lyons, S A, Nelson, G M, Hamza, H, Gladson, C L, Gillespie, G Y., Sontheimer, H. Inhibition of cystine uptake distupts the growth of primary brain tumors. **J Neurosci** v.25, p. 7101-7110. 2005.

Dai, H.; Marbach, P.; Lemaire, M.; Hayes, M.; Elmquist, W. Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein mediated efflux. **J Pharmacol Exp Ther.** v.304, p. 1085-1092. 2002.

Danbolt, N.C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.** v.65, p. 1–105, 2001.

Damio, G.; Filiberti, L.; Vikhanskaya, F.; Carrasa, L.; Taya, Y.; Dincalci, M.; Brogini, M. Cisplatin and taxol induce different pattern of p53 phosphorylation. **Neoplasia.** v.3, p.10-16. 2001.

De Ridler, L.I.; Laerum, O.D.; Bigner, D.D. Invasiveness of human glioma cell lines in vitro: relation to tumorigenicity in athymic mice. **Acta Neuropathol.** v.72, p.207-213. 1987.

Desjardins, A.; Rich, J.N.; Quinn, J.A.; Vredenburg, J.; Gururangan, S.; Sathornsumetee, S.; Reardon, D.A.; Friendman, A.H.; Bigner, D.D.; Friendman, H.S. Chemotherapy and novel therapeutic approaches in malignant gliomas. **Front Biosci.** v.10, p.2645-2668. 2005.

Dörner, L.; Mustafa, A.; Rohr, A.; Mehdorn, H.M.; Nabavi, A. Growth pattern of tumor recurrence following bis-chloroethylnitrosurea (BCNU) wafer implantation in malignant glioma. **J Clin Neurosci.** In press – Corrected proof. 2013.

Dow, K.E.; Wang, W. Cell biology of astrocyte proteoglycans. **Cell Mol Life Sci.** v.54, p.567-581. 1998.

Dun, Y.; Mysona, B.; Van Ells, T.; Amarnath, L.; Ola, M. S.; Ganapathy, V.; Smith, S. B. Expression of the cystine-glutamate exchanger (Xc-) in retinal ganglion cells and regulation by nitric oxide and oxidative stress. **Cell Tissue Res.** v.324, p.189-202. 2006.

Garfield, J.S. Neurosurgical aspects of supratentorial malignant gliomas. **Proc. R. Soc. Med.** v.69, p.53-55. 1976.

Gong, J.G.; Conzanzo, A.; Yang H.Q.; Melino, G.; Kaelin, W.G.Jr.; Levvero, M.; Wang, J.Y. The tyrosine kinase –ALB regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. **Nature.** v.399, p.806-809. 1999.

Groot, J. e Sontheimer, H. Glutamate and the biology of gliomas. **Glia**. v.59, p.1181-1189. 2011.

Guillet, B. A.; Velly, L. J.; Canolle, B.; Masméjean, F. M.; Nieoullon, A. L.; Pisano, P. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. **Neurochem Int**. v.46, p.337-346. 2005.

Gwak, H.S.; Youn, S.M.; Kwon, A.H.; Lee, S.H.; Kim, J.H.; Rhee, C.H. ACNU-cisplatin continuous infusion chemotherapy as salvage therapy for recurrent glioblastomas: phase II study. **J Neurooncol**. v.75, p.173-180. 2005.

Halliwell, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochem J**. v.401, p.1-11. 2007.

Hassenbusch, S.J.; Nardone, E.M.; Levin, V.A.; Leeds, N.; Pietronigro, D. Stereotactic injection of DTI-015 into recurrent malignant gliomas: phase I/II trial. **Neoplasia**. v.5, p.9-16. 2003.

Hung, M.C. e Lau, Y.K. Basic science of HER-2/neu: a review. **Semin Oncol**. v.26, p.51-59. 1999.

Huo, T.; Barth, R.F.; Yang, W.; Nakkula, R.J.; Koynova, R.; Tenchov, B.; Chaudhury, A.R.; Agius, L.; Boulikas, T.; Elleaume, H.; Lee, R.J. Preparation, biodistribution and neurotoxicity of liposomal cisplatin following convection enhanced delivery in normal and F98 glioma bearing rats. **Plos One**. v.7. 2012.

Jacobsson, S.O.; Fowler, C.J. Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephalic cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. **Neurochem Int**. v.34, p.49 – 62, 1999.

Jiang, Y & Uhrbom, L. On the origin of glioma. **Ups J Medi Sci**. v.117, p.113-121. 2012.

Kanai, Y. e Hediger, M. A. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. **Eur J Pharmacol**. v.479, p.237-247. 2003.

Kelland, L R. New platinum antitumor complexes. **Crit. Rev. Oncol. Hematol** v.15, p.191-219. 1993.

Kew, J. N.; Kemp, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, v.179, p.4-29, 2005.

Kim, C. H.; Lee, J.; Lee, J. Y.; Roche, K. W. Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. **J Neurocience Res.** v.86, p.1-10. 2008.

Kim, J.W. e Dang, C.V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. **Cancer Res.** v.66, p.8927-8930. 2006.

Kreisl, T.N. Chemotherapy for malignant gliomas. **Semin Radiat Oncol.** v.19, p.150-154. 2009.

Laming, P.R.; Kimelberg, H.; Robinson, S.; Salm, A.; Hawrylak, N.; Müller, C.; Roots, B.; Ng, K. Neuronal-glia interactions and behavior. **Neurosci Biobehav Rev.** v.24, p.295-340. 2000.

Lau, A.; Tymianski, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Arch.** v.460, 525-542. 2010.

Lim, J.C.; Donaldson, P.J. Focus on molecules: the cystine/glutamate exchanger (System x(c)(-)). **Exp Eye Res.** v.93, p.162-163. 1988.

Liu, C, Sage, J C, Miller, M R, Verhaak, R G, Huppenmeyer, S, Vogel, H, Foreman, O, Bronson, R T, Nishiyama, A, Luo, L, Zong, H. Mosaic analysis with double markers (MADM) reveal tumor cell-of-origin in glioma. **Cell.** v.146, p. 209-221. 2011.

Lomako, J.; Lomako, W. M.; Whelan, W. J.; Dombro, R. S.; Neary, J. T.; Noremborg, M. D. Glycogen synthesis in the astrocytes: from glycogenin to proglycogen to glycogen. **FASEB J.** v.7, p.1386-1393. 1993.

Louis, D. N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W. K.; Burger, P. C.; Jouvett, A.; Scheithauer, B. W.; Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol.** v.114, p.97-109. 2007.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** v.193, p.265-75. 1951.

Lyons, S.A.; Chung, W.J.; Weaver, A.K.; Ogunrinu, T.; Sontheimer, H. Autocrine glutamate signals promote glioma invasion. **Cancer Res.** v.67, p.9463-9471. 2007.

Mattson, M.P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. **Neuromolecular Med.** v.3, p.65-94. 2003.

Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr.** v.130, p.1007-1015. 2000.

Mendes-De-Aguiar, C. B.; Alchini, R.; Zucco, J. K.,; Costa-Silva, B.; Decker, H.; Alvarez-Silva, M.; Tasca, C. I.; Trentin, A. G. Impaired astrocytic extracellular matrix distribution under congenital hypothyroidism affects neuronal development in vitro. **J Neurosci Res.** v.88, p.3350-3360. 2010.

Mistry, P, Kelland, L R, Abel, G, Sidhar, S, Harrap, K R. The relationships between glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines **Br J Cancer.** v.64, p.215-220. 1991.

Molz, S.; Dal-Cim, T.; Tasca, C. I. Guanosine-5'-monophosphate induces cell death in rat hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake inhibition. **Experimental Neurology** v.55, p.703-709. 2009.

Niciu, M.J.; Kelmendi, B.; Sanacora, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacol Biochem Behav.** v.100, p.656-664. 2012.

Noch, E. e Khalili, K. Molecular mechanisms of necrosis in glioblastoma: The role of glutamate excitotoxicity. **Cancer Biology & Therapy.** v.8, p.1791-1797. 2009.

Ogunrinu, T.A. e Sontheimer, H. Hypoxia increases the dependence of glioma cells on glutathione. **J Biol Chem.** v.285, p.37716-37724. 2010.

Ohgaki, H.; Dessen, P.; Jourde, B.; Horstmann, S.; Nishikawa, T.; Di Patre, P. L.; Burkhard, C.; Schüler, D.; Probst-Hensch, N. M.; Maiorka, P. C.; Baeza, N.; Pisani, P.; Yanekawa, Y.; Yasargil, G.; Lütolf, U.M.; Kleihues, P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res.** v.64, p.6892-6899. 2004.

Ohgaki, H. e Kleihues, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. **J Neuropathol Exp Neurol.** v.64, p.479-489. 2005

Ohgaki, H. e Kleihues, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Sci.** v.100, p. 2235–2241. 2009.

Oren, M, Damalas, A, Gottlieb, T, Michael, D, Taplick, J, Leal, J F, Maya, R, Moas, M, Seger, R, Taya, Y, Ben-Ze'Ev, A. Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. **Ann NY Acad Sci.** v.973, p.374-383. 2002.

Parpura, V.; Baker, B. J.; Jeras, M.; Zorec, R. Regulated exocytosis in astrocytic signal integration. **Neurochem Int.** v.57, p.451-459. 2010.

Persson, A. I.; Petrisch, C.; Swartling, F. J.; Itsara, M.; Sim, F. J.; Auvergne, R.; Goldenberg, D. D.; Vandenberg, S. R.; Nguyen, K. N.; Yakovenko, S.; Ayers-Ringler, J.; Nishiyama, A.; Stallcup, W. B.; Berger, M. S.; Bergers, G.; McKnight, T. R.; Goldman, S. A.; Weiss, W. A. Non-stem cell origin for oligodendroglioma. **Cancer Cell.** v.18, p.669-682. 2010.

Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.** v.83, p.346-356, 1977.

Pojo, M. e Marques, B. Molecular Hallmarks of Gliomas, Molecular Targets of CNS Tumors. Miklos Garami (Ed), ISBN: 978-953-307-736-9, Intech, DOI: 10.5772/21352. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/molecular-targets-of-cns-tumors/molecular-hallmarks-of-gliomas>. 2011.

Prestayko, A.W.; D'Aoust, J.C.; Issel, B.F.; Crooke, S.T. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). **Cancer Treat Rev.** v.6, p.17-39. 1979.

Rainov, N.G.; Söling, A.; Heidecke, V. Novel therapies for malignant gliomas: a local affair?. **Neurosurg Focus.** v.20. 2006.

Re, D. B.; Boucraut, J.; Samuel, D.; Birman, S.; Kerkerian-Le Goff, L.; Had-Aissouni, L. Glutamate transport alteration triggers differentiation-state selective oxidative death of culture astrocytes: a mechanism different from excitotoxicity depending on intracellular GSH contents. **J. Neurochem.** v.85, p.1159-1170. 2003.

Reardon, D.A.; Rich, J.N.; Friendman, H.S.; Bigner, D.D. Recent advances in treatment of malignant astrocytoma. **J Clin Oncol.** v.24, p.1253-1265. 2006.

Robe, P.A.; Martin, D.; Albert, A.; Deprez, M.; Chariot, A.; Bours, V. A phase 1-2, prospective, double blind, randomized study of the safety and efficacy of sulfasalazine for the treatment of progressing malignant gliomas: study protocol of [ISRCTN45828668]. **BMC Cancer.** v.6, p.29. 2006.

Rosenblum, M.L.; Reynolds, A.F.Jr.; Smith, K.A.; Rumack, B.H.; Walker, M.D. Chloroethyl-cyclohexyl-nitrosurea (CCNU) in treatment of malignant brain tumors. **J Neurosurg.** v.39, p.306-314. 1973.

Rothstein, J. D.; Jin, L.; Dykes-Hoberg, M.; Kuncl, R. W. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci.** v.90, p.6591-6595. 1993.

Sanacora, G., Zarate, C.A., Krystal, J.H., Manji, H.K.. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature Rev Drug Disc.** v.7, p.426-437, 2008.

Savascan, N C, Heckel, A, Hahnen, E, Engelhorn, T, Doerfler, A, Ganslandt, O, Nimsky, C, Buchfelder, M, Eyüpoglu, I Y. Small interfering RNA-mediated xCT silencing in gliomas inhibits neurodegeneration and alleviates brain edema. **Nat Med.** v.14, p.29-632. 2008.

Schousbe, A. e Waagepetersen, H. S. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. **Neurotox Res.** v.8, p.221-225. 2005.

Siddik, Z H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene.** v.22, p.7265-7279. 2003.

Siegel, G. J.; Albers, R.W.; Brady, S.T.; Price, D.L. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects.** 7th ed., Elsevier Academic Press: Burlington, 2006.

Singh, S. K.; Hawkins, C.; Clarke, I. D.; Squire, J. A.; Bayani, J.; Hide, T.; Henkelman, R. M.; Cusimano, M. D.; Dirks, P. B. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature.** v.432, p.396-401, 2004.

Szydłowska, K.; Tymianski, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. **Cell Calcium.** v.47, 122-129, 2010.

The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature.** v.455, p.1061-1068. 2008.

Ummat, A.; Rechkoblit, O.; Jain, R.; Choudhury, J.R.; Johnson, R.E.; Silverstein, T.D.; Buku, A.; Lone, S.; Prakash, L.; Prakash, S.; Aggarwal, A.K. Structural basis for cisplatin DNA damage tolerance by human polymerase η during cancer chemotherapy. **Nat Struct Mol Biol.** v.19, p.628-632. 2012.

Ungard, R e Singh, G. Oxidative stress and glutamate release in glioma. Glioma – Exploring its Biology and Pratical Relevance. Dr Anirban Ghosh (Ed.) ISBN: 978-953-307-379-8, In Tech, DOI: 10.5772/21930. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/glioma-exploring-its-biology-and-practical-relevance/oxidative-stress-and-glutamate-release-in-glioma>. 2011.

Wang, Y. e Qin, Z.H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis.** v.15, p.1382-1402. 2010.

Westphal, M. & Lamszus, K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nat Rev Neurosci.** v.12, p. 495-508. 2011.

Wicks, A, Wick, W, Hirrlinger, J, Gerhardt, E, Dringen, R, Dichgans, J, Weller, M, Schulz, J B. Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: in vitro paradigm of differential neurotoxicity. **J Neurochem** v.91, p.1067 – 1074. 2004.

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. **J Neurosci**. v.19, p.10767-10777. 1999.

Ye, Z.C. e Sontheimer, H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. **Cancer Res**. v.59, p.4383– 4391. 1999.

Yoo, B.K.; Emdad, L.; Lee, S.G.; Su, Z.Z.; Santhekadur, P.; Chen, D.; Gredler, R.; Fisher, P.B.; Sarkar, D. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): A multifunctional regulator of normal and abnormal physiology. **Pharmacol Ther**. v.130, p.1-8. 2011.