



**Universidade Federal
de Santa Catarina**

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DE GLIOMAS

LABORATÓRIO DE NEUROQUÍMICA - 4

ESTUDO DOS EFEITOS DA CISPLATINA SOBRE O SISTEMA TROCADOR CISTINA-

GLUTAMATO EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO A172

LUCAS FELIPE FERNANDES BITTENCOURT

Florianópolis, dezembro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DOS EFEITOS DA CISPLATINA SOBRE O SISTEMA TROCADOR CISTINA-
GLUTAMATO EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO A172**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO

(Trabalho de Conclusão de Curso II – BIO 7016)

Acadêmico: Lucas Felipe Fernandes Bittencourt

Ciências Biológicas, 8ª fase

Orientador: Prof.^a Dr.^a Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

Laboratório de Biologia de Gliomas/Laboratório de Neuroquímica - 4

**ESTUDO DOS EFEITOS DA CISPLATINA SOBRE O SISTEMA TROCADOR CISTINA-GLUTAMATO EM
CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO A172**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para a
obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora

Prof. ^a Dr. ^a Cláudia B.N. Mendes de Aguiar (Presidente)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez (Membro Titular)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

M.Sc. Tharine A. Dal-Cim (Membro Titular)
Departamento de Bioquímica - UFSC

Prof. ^a Dr. ^a Cristine Maria Bressan (Membro Suplente)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Florianópolis, 01 de dezembro de 2011

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente e principalmente de agradecer aos meus pais, minha irmã e vó, por todo o apoio, incentivo, compreensão e paciência comigo durante a elaboração deste trabalho.

Em seguida, agradeço aos meus grandes amigos: Camila, por sempre me dizer o que eu preciso ouvir e não o que quero; ao Matheus, por ser um grande amigo e alicerce de confiança em toda a minha vida adulta; e à Regina, por incontáveis conversas científicas, carinho, atenção e admiração pela vida em todas as suas instâncias. Agradeço por serem meus companheiros inseparáveis neste em diversos outros pontos importantes da minha vida. Agradeço a lulo pelas correções ortográficas e pelo apoio incondicional. Agradeço à Manoela por ser uma fiel amiga e incentivadora da busca pelos meus objetivos.

De forma ampla agradeço a todos os professores do curso de graduação em Ciências Biológicas que contribuíram para a minha formação acadêmica, tanto por aulas quanto por conversas, idéias e orientações.

Agradeço ainda meus colegas da biologia, em especial: Andressa, Bruna, Carine, Elisa, Pedro, Renata e Stefanny por incontáveis momentos de felicidade, papos, festas e por me propiciarem uma genuína experiência universitária.

Agradeço às minhas colegas de laboratório Paula e Karen, que rapidamente se tornaram pessoas muito importantes para mim. E é claro, a todos do Laboratório de Neuroquímica que me ajudaram e ensinaram muito: Carla, Fabiana, Giordano, Leandra, Samuel, Tharine e Wagner.

Por último, e definitivamente não menos importante, agradeço à Cláudia, minha orientadora e amiga, que me acolheu e deu um norte, me incentivando nos meus trabalhos científicos e continuação dos estudos, sem contar os ótimos momentos que passamos juntos durante a elaboração deste trabalho, as discussões científicas e a admiração pelo grande Sontheimer.

RESUMO

Gliomas malignos correspondem a um grupo heterogêneo de tumores do sistema nervoso central (SNC). A maioria destes tumores se origina da transformação neoplásica de astrócitos, com crescimento inicial lento, progredindo para astrocitomas que podem originar a forma mais agressiva de tumores derivados de células gliais. Astrócitos transformados perdem a capacidade de controlar sua proliferação e ainda de exercer seu papel como reguladores das funções do SNC. Gliomas ativam mecanismos capazes de aumentar os níveis extracelulares de glutamato. Desta forma, estas células podem se tornar capazes de causar a morte das células peritumorais por excitotoxicidade glutamatérgica, constituindo assim uma via de invasão, resistência e crescimento tumoral. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o transporte de glutamato em células de glioblastoma humano A172, após o tratamento com o quimioterápico cisplatina. Não foram observadas alterações na viabilidade destas células após o tratamento com cisplatina (50 e 100 μM). Demonstramos também um aumento significativo e dose-dependente na liberação de glutamato por estas células tratadas com cisplatina. Ainda, a inibição do trocador cistina-glutamato com sulfasalazina promoveu uma redução significativa nos níveis de glutatona intracelular, sugerindo que a liberação exarcebada de glutamato por estas células de glioma provavelmente é mediada por este sistema trocador. Estes estudos são de fundamental importância para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nestes processos e assim desenvolver novos tratamentos coadjuvantes para os gliomas, buscando assim melhores prognósticos para pacientes acometidos por esta doença.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	7
1.1 - Tumores do sistema nervoso central	7
1.1.1 - Glioblastomas Multiformes	9
1.1.2 - Glutamato	10
1.2 - Quimioterapia e Cisplatina	14
2 - OBJETIVO GERAL	16
2.1 – Objetivos específicos	16
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 - Culturas celulares	17
3.2 – Tratamentos	17
3.3 - Viabilidade celular por MTT	18
3.4 - Análise da liberação de glutamato	18
3.5 - Imunodeteção do trocador cistina-glutamato	19
3.6 – Avaliação da quantidade de glutathiona intracelular	19
3.7 - Análise estatística	20
4 - RESULTADOS	21
4.1 - Determinação da viabilidade celular:	21
4.1.1 – Cisplatina	21
4.1.2 – Sulfasalazina	21
4.2 - Liberação de Glutamato	23
4.3 - Imunodeteção do trocador cistina-glutamato	23
4.4 – Quantificação da glutathiona intracelular	26
5 - DISCUSSÃO	27
6 – CONCLUSÕES	30
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Tumores do sistema nervoso central

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) estão entre as neoplasias de pior diagnóstico da medicina. Difíceis de tratar e com um prognóstico pobre e frequentemente circundado de sequelas permanentes, as neoplasias do SNC foram classificadas de muitas maneiras. A classificação utilizada neste trabalho é a da WHO (World Health Organization - OMS - Organização Mundial da Saude), que é uma classificação baseada na histologia do tumor (Tabela 1). Com isto, é possível classificar o tipo de câncer e prever, com uma boa margem de segurança, o prognóstico e evolução da doença.

Tipo de tumor a ser codificado	Grau OMS	Código CID-O	Código de comportamento CID-O 5º dígito
Tumores astrocíticos (astrocitoma)			
Sub ependimal de células gigantes	I	9384	1
Pilocítico	I	9421	1
Baixo grau	II	9400	3
Xantastrocitoma pleomórfico	II-III	9424	3
Anaplásico	III	9401	3
Glioblastoma	IV	9440	3
Oligodendrogliomas			
Baixo grau	II	9450	3
Anaplásico	III	9451	3
Oligoastrocitomas			
Baixo grau	II	9382	3
Anaplásico	III	9382	3
Tumores ependimais (ependimoma)			
Subependimoma	I	9383	1
Mixopapilar	I	9394	1
Baixo grau	II	9391	3
Anaplásico	III	9392	3
Tumores do plexo coróide			
Papiloma	I	9390	0
Carcinoma	III-IV	9390	3
Tumores neuronais/gliais			
Gangliocitoma	I	9492	0
Ganglioglioma	I-II	9505	1
Ganglioglioma anaplásico	III	9505	3
Ganglioglioma desmoplásico infantil	I	9412	1
Tumor neuroepitelial disembríoplásico	I	9413	0
Neurocitoma central	I	9506	1

Tabela 1 - Classificação de tumores cerebrais segundo a Organização Mundial de Saude (OMS) (modificado de Classificação Internacional de Doenças para Oncologia, 2005).

Nesta classificação, a nota que foi dada a cada tipo de tumor baseia-se na sua agressividade e malignidade, sendo uma ferramenta médica de suma importância no momento de decidir o tratamento do paciente, principalmente ao que se diz respeito da escolha de protocolos de quimioterapia e radioterapia adjuvante.

Determinou-se então pela WHO a criação de quatro notas de severidade de tumores:

- Nota I, se aplica a tumores com baixo potencial proliferativo e com possibilidade de cura apenas com cirurgia.
- Nota II define tumores infusivos que apresentam anaplasia e taxa mitótica levemente acentuada.
- Nota III é geralmente reservada à lesões com evidência histológica de malignidade, incluindo atipia nuclear e vigorosa atividade mitótica. Pacientes portadores de neoplasias nota III frequentemente são recomendados para radioterapia adjuvante e quimioterapia.
- Nota IV é designada a tumores citologicamente malignos, mitoticamente ativos, com tendências à necrose e tipicamente associados com rápida evolução pré e pós cirúrgica, sumariamente fatal. (Kleihues *et al.*, 1993).

O alvo deste trabalho de conclusão de curso, o glioblastoma multiforme (GBM), é um tumor de nota IV, sendo então considerado de mau prognóstico e com diversas características agravantes.

1.1.1 - Glioblastomas Multiformes

O GBM é o mais frequente tumor cerebral primário em humanos, sendo caracterizado por um rápido crescimento e conseqüente alta letalidade. Pacientes diagnosticados com GBM apresentam sobrevida menor do que um ano e, mesmo em condições favoráveis, muitos portadores desta doença morrem dentro de dois anos (Stupp *et al.*, 2005). A grande maioria deste tipo de tumor se origina da transformação neoplásica de astrócitos, com crescimento inicial lento e progredindo para astrocitomas (Figura 1) que podem originar a forma mais agressiva dos tumores derivados de células gliais (Ye *et al.*, 1999).

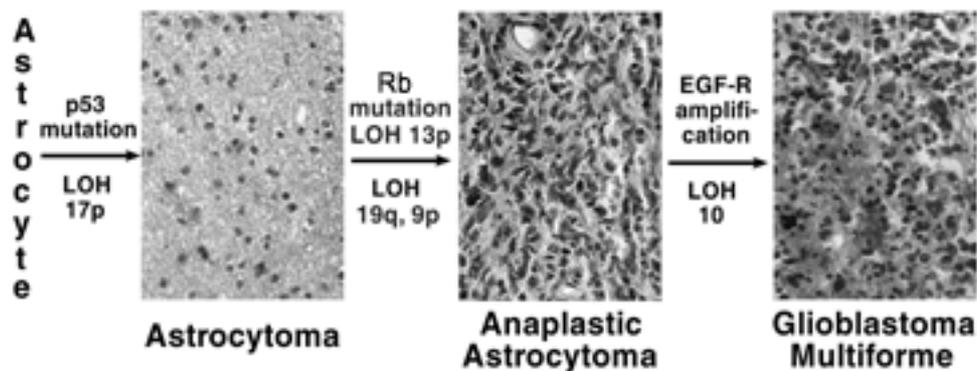


Figura 1 - Esquema representativo da progressão de astrócitos normais até glioblastoma multiforme (Fonte: <http://neurosurgery.mgh.harvard.edu/newwhobt.html>).

A transformação de astrócitos normais em células tumorais promove a perda da capacidade destas células de controlar seu crescimento e, ainda, de exercer seu papel como reguladores das funções do SNC, levando, entre outros, à diminuição da captação

do glutamato dos espaços extracelulares. Além disso, estas células tornam-se capazes de liberar glutamato em excesso nos espaços peritumorais, causando morte das células ao redor do tumor por excitotoxicidade, levando-as à apoptose e constituindo assim uma via de invasão e crescimento tumoral (Sontheimer, 2008).

1.1.2 - Glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos e está diretamente envolvido em processos que incluem plasticidade, aprendizado, memória e desenvolvimento neural (Meldrum, 2000). Este neurotransmissor é parte essencial de processos bioquímicos de oxidação para geração de energia, síntese de proteínas e formação de compostos variados. Sua ação excitatória no sistema nervoso foi descoberta por Hayashi (1954), quando este verificou que a injeção de glutamato sódico no córtex motor de caninos e primatas levava os animais a convulsionarem (para revisão, ver Takeuchi, 1987). Além disto, o glutamato é mediador químico de cerca de 80 a 90% das sinapses excitatórias do cérebro (McKenna, 2007).

O glutamato pode ser sintetizado de duas formas: a partir do α -cetoglutarato (α -CG) do ciclo de Krebs, sendo a desidrogenase do ácido glutâmico (GDH) a enzima responsável por catalisar esta reação. Nos astrócitos, o glutamato pode seguir quatro destinos diferentes: 1 - voltar para o ciclo de Krebs como α -CG, reação catalisada pela própria GDH, ou pela aspartato aminotransferase (AAT); 2 - ser utilizado para a síntese de glutatona; 3 - ser metabolizado para a formação de CO₂ e H₂O; 4 - ser substrato para a síntese da glutamina (Figura 2) pela glutamina sintetase (GS), que é uma enzima chave em duas importantes vias bioquímicas: no fígado a GS catalisa a detoxificação da amônia e no cérebro, além deste papel, garante a reciclagem do neurotransmissor glutamato, estando localizada nos astrócitos (Matthews *et al*, 2005).

A glutamina é liberada pelos astrócitos e captada por neurônios para ser novamente convertida em glutamato pela enzima glutaminase ativada por fosfato (PAG), ciclo este conhecido como glutamina-glutamato. Normalmente, quando há excesso de glutamato extracelular, as células gliais atuam no sentido de diminuir a excitabilidade e excitotoxicidade produzida por glutamato. Para isso, estas células captam o glutamato e o utilizam como substrato para a síntese de proteínas ou moléculas como a glutatona, que é neuroprotetora (Guimarães-Souza, 2010).

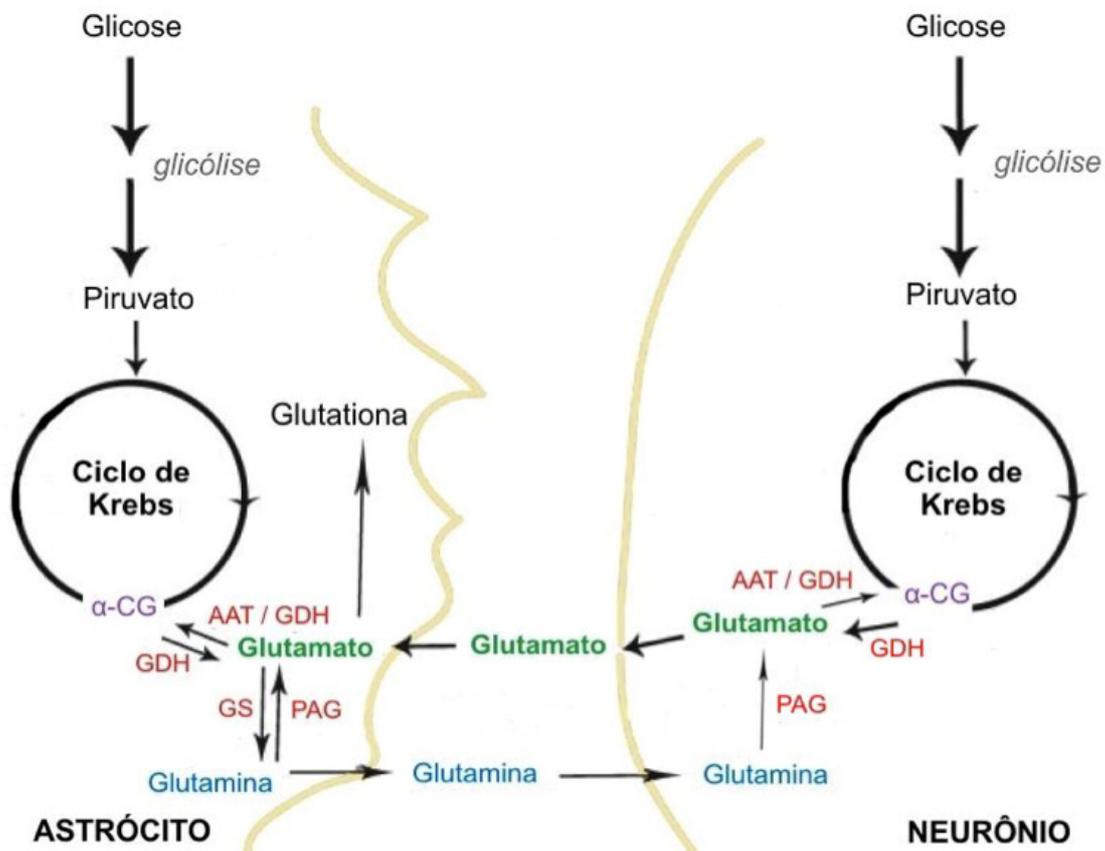


Figura 2 – Esquema ilustrando o ciclo glutamato-glutamina realizado pelos astrócitos (modificado de McKenna, 2007).

O glutamato, após ser sintetizado, é então estocado nas vesículas que se encontram no terminal pré-sináptico. No momento em que se dá a despolarização dos terminais sinápticos glutamatérgicos, o glutamato que se encontra nas vesículas é liberado para o meio extracelular (fenda sináptica) para interagir com seus receptores ionotrópicos e metabotrópicos que estão localizados nas membranas pré e pós-sinápticas e membranas gliais. Após esta interação, o glutamato é removido da fenda sináptica pelos transportadores de glutamato dependentes e independentes de sódio (Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Santos *et al.*, 2006).

São conhecidos cinco tipos de transportadores de glutamato dependentes de sódio que estão bem identificados e caracterizados: GLAST (EAAT1), GLT-1 (EAAT2), os quais são astrocitários, EAAC1 (EAAT3), EAAT4 e EAAT5, os quais são neuronais (Amara & Fontana, 2002). Os transportadores de glutamato (Figura 3) localizados nas membranas das células gliais são de fato os responsáveis pela manutenção dos baixos níveis extracelulares de glutamato, garantindo dessa forma a homeostase celular (Anderson & Swanson, 2000; Tanaka 2000; Amara & Fontana, 2002).

Além dos transportadores clássicos de glutamato, é conhecido um outro tipo de transportador glutamatérgico - o sistema trocador de cistina-glutamato, também conhecido como sistema X_c^- . Este é um transportador de glutamato independente de sódio, o qual promove o efluxo de glutamato concomitante ao influxo de cistina. Embora não se tenha totalmente claro como as células tumorais regulam a liberação de glutamato, diversos trabalhos demonstram que o trocador cistina-glutamato está envolvido na liberação exacerbada de glutamato por células de glioma (Ye *et al.*, 1999; Lyons *et al.*, 2007; Sontheimer, 2008).

O trocador cistina-glutamato é composto por dois domínios proteicos ou subunidades diferentes: a subunidade 4F2hc, que determina a regulação e localização do heterodímero na membrana, chamada de cadeia pesada regulatória e a subunidade xCT

que tem ação catalítica chamada de cadeia leve catalítica (Sontheimer, 2008). Em células astrocíticas normais existe uma expressão constante de 4F2hc na região perinuclear (complexo de Golgi). Essa baixa expressão do trocador cistina-glutamato na membrana plasmática de células normais pode explicar a baixa liberação de glutamato por estas células. Por outro lado, células de glioma expressam abundantemente o trocador cistina-glutamato (Lyons *et al.*, 2007; Takano *et al.*, 2001)

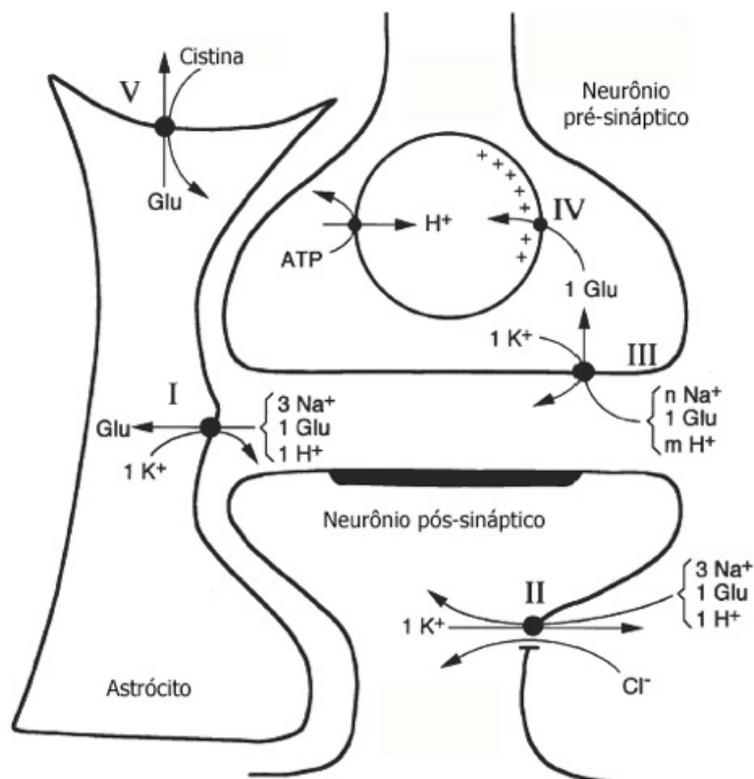


Figura 3 – Esquema representativo dos tipos de transportadores de glutamato presentes nas sinapses glutamatérgicas. (I) Transportadores de glutamato em astrócitos, GLAST e GLT-1; (II) transportadores de glutamato em neurônios pós-sinápticos, (III) nos terminais pré-sinápticos e (IV) nas vesículas sinápticas; (V) influxo de cistina pelo transportador antiporte de glutamato-cistina do tipo xCT. Glu: glutamato. ATP: adenosina trifosfato. Adaptado de Danbolt (2001).

O trocador cistina-glutamato funciona transportando uma molécula de cistina (forma oxidada da cisteína) para o meio intracelular e libera uma molécula de glutamato para o meio extracelular. A cistina é precursora da glutathione (GSH), que exerce um papel protetor contra o estresse oxidativo endógeno por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) e exógeno por radiação e quimioterápicos (McBean, 2002). Assim, as células de glioma podem causar a morte das células normais do tecido ao redor do tumor e, além disto, aumentar as defesas antioxidantes das células tumorais, tornando-as mais resistentes e proporcionando ao tumor maior capacidade invasiva.

1.2 - Quimioterapia e Cisplatina

Quimioterapia e a radioterapia ainda são as principais terapias adjuvantes contra o câncer, entretanto, apesar de décadas de pesquisas, o prognóstico para pacientes com esta doença e principalmente com GBM ainda é muito ruim. Um dos quimioterápicos mais utilizados no tratamento de glioblastomas é a cisplatina, a qual tem atividade anti-tumoral atribuída à ligação ao DNA, com formação de adutos, originando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais no DNA. O efeito citotóxico da cisplatina é, assim, causado pela inibição da transcrição e replicação e induzindo a apoptose. A tradução também é afetada, mas num grau menos acentuado (Goodsell, 2006). Entretanto, um dos fatores que pode explicar os desapontadores resultados observados no tratamento desta doença é a capacidade de resistência ou quimiorresistência às drogas que as células tumorais exibem. A quimiorresistência é um fenômeno conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR – *multiple drug resistance*) e pode ser relacionada à alta recorrência e agressividade de tumores, constituindo a principal causa dos pobres prognósticos associados a este tipo de tumor (Charest *et al.*, 2009; Vanpouille *et al.*, 2009). Entretanto, os fatores pelos quais as células tumorais tornam-se

quimiorresistentes não estão totalmente elucidadas. O transporte aberrante de glutamato pelas células tumorais poderia ser um destes fatores. Desta forma, estes estudos são de fundamental importância, para que se possa desvendar os mecanismos moleculares envolvidos neste processo e assim desenvolver novos tratamentos coadjuvantes para os gliomas e também para outros tipos tumorais, buscando assim melhores prognósticos para pacientes acometidos por câncer.

2 - OBJETIVO GERAL

Avaliar a modulação da liberação de glutamato, bem como a expressão do sistema trocador cistina-glutamato em células de glioblastoma humano A172 tratadas com o quimioterápico cisplatina.

2.1 – Objetivos específicos

- Avaliar o envolvimento do trocador cistina-glutamato, na regulação da liberação de glutamato, com o uso de cisplatina e do inibidor deste sistema, sulfasalazina.
- Verificar, nestas culturas, a expressão do trocador cistina-glutamato com e sem o tratamento de cisplatina.
- Quantificar a glutatona intracelular na linhagem A172 antes e depois do tratamento com cisplatina e com sulfasalazina.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Culturas celulares

A linhagem de glioblastoma humano A172 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Guido Lenz, do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25cm² (10⁶ células) ou em placas de cultura de 24 (10⁵ células) ou 6 poços (10⁶ células), conforme o experimento. As células foram mantidas em DMEM-F12 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco), em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Estas células atingem a confluência em geral em 24 horas, portanto, no dia seguinte ao plaqueamento, o meio de cultura era trocado por DMEM-F12 desprovido de SFB, adicionado de cisplatina e/ou sulfasalazina, conforme descrito abaixo.

3.2 – Tratamentos

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina - Sigma) foi solubilizada em tampão salina fosfato (PBS), pH 7,4 na concentração de 2mM e posteriormente foi diluída em meio de cultura DMEM-F12, sem adição de SFB. Após a confluência, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura com cisplatina, nas concentrações finais de 50µM e 100uM, foi adicionado e mantido em cultura por 24 horas. Para se verificar o envolvimento do sistema trocador cistina-glutamato foi utilizada a sulfasalazina (SAS), a qual inibe este sistema de forma específica (Chung *et al.*, 2005). Para isso, a SAS foi solubilizada em DMSO (dimetilsulfóxido - VETEC) , constituindo uma solução mãe de 30mM que foi então diluída em DMEM-F12 e incubada nas células em associação ou não com a cisplatina por 24 horas na concentração final de 300 µM/mL.

3.3 - Viabilidade celular por MTT

Com o intuito de conhecer as melhores concentrações de uso das drogas, foi utilizado o método de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio - GE Healthcare). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, convertido em formazana púrpura após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais, avaliando desta forma a viabilidade celular. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após a confluência tratadas por 24 horas com cisplatina e/ou sulfasalazina. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas com MTT (0,5 mg/ml) dissolvido em PBS por 2 horas a 37°C. A solução foi então removida e o composto foi solubilizado com 100 µL de DMSO e analisado em leitor de Elisa (540 nm). A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância obtida.

3.4 - Análise da liberação de glutamato

A liberação de glutamato foi realizada segundo descrito por Molz e colaboradores (2008). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e após a confluência, o meio de cultura foi removido e as células incubadas com solução salina de Hanks (HBSS) (pH 7,2) por 15 min. Em seguida foram adicionados 0,33 µCi/ml de L-[³H]aspartato (concentração final 100 µM - GE Healthcare) por 7 min iniciando a captação. Após esse período as células foram lavadas 3 vezes com HBSS (CaCl₂ 1,29 mM (dihidratado), NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, Glicose 2 mM, Hepes 5 mM) gelado para a interrupção da atividade dos transportadores e a retirada do excesso de L-[³H]aspartato não captado. As células foram então novamente incubadas por 15 minutos em HBSS e o sobrenadante (efluxo) foi coletado para mensurar a quantidade de L-[³H]aspartato liberado. Depois, as células restantes foram lisadas por aproximadamente 12 horas com SDS (dodecil sulfato de sódio - GE Healthcare)/NaOH

(LABSYNTH) 0,1% e o lisados foi coletado para mensurar a quantidade de L-[³H]aspartato não-liberado. Os níveis de L-[³H]aspartato intra e extracelulares foram analisados por contagem de cintilação e calculados em nanomol de glutamato por miligrama de proteína por minuto. A quantidade de L-[³H]aspartato liberada é expressa em porcentagem do controle.

3.5 - Imunodeteção do trocador cistina-glutamato

Após o tratamento com a cisplatina, as culturas de glioblastomas humanos A172 foram solubilizadas em tampão de extração de proteínas contendo Tris (10 mM), EDTA (2 mM - REAGEN) e β - mercaptoetanol (2 mM - GE Healthcare), em gelo. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e separadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (AMRESCO) 12% (SDS-PAGE) de acordo com o sistema de Laemmli e colaboradores (1970). Depois de separadas, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose que foram então incubadas por 12 horas a 4°C com anticorpo para a subunidade regulatória 4F2hc do trocador cistina-glutamato (AbCam, 1:1.000). Após esse período, as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Sigma, 1:5.000). A imundeteção foi realizada pelo método de quimioluminescência (ECL). As bandas proteicas imunorreativas foram analisadas por densitometria ótica, com a utilização do software Scion Image (*National Institutes of Health*, EUA), sendo normalizadas pela expressão de β -actina.

3.6 – Avaliação da quantidade de glutatona intracelular

As células foram homogeneizadas em ácido carboxílico da pirrolidona (PCA) 0,5 M, para precipitar as proteínas e então centrifugadas por 15000g por 5 minutos. O

sobrenadante foi utilizado para a análise de glutathione. A glutathione total (GSH) foi medida através do método de Tietze, modificado por Akerboom e Sies (1981). O método se baseia na reação espontânea do DTNB (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) com a GSH, formando TNB (5-mercaptop-2-nitrobenzóico) e GS-TNB (TNB conjugado à glutathione). O GS-TNB por sua vez é reduzido novamente à GSH pela enzima Glutathione Redutase utilizando NADPH, liberando o TNB. A velocidade de formação de TNB é medida espectrofotometricamente a 340 nm por 2 minutos e comparada com uma curva padrão.

3.7 - Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste ANOVA (*one-way ANOVA*), seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.0, admitindo-se um nível de significância $p < 0,05$.

4 - RESULTADOS

4.1 - Determinação da viabilidade celular:

4.1.1 – Cisplatina

Em estudos anteriores não publicados, com células de melanoma murino B16F10, foi demonstrado que as concentrações de cisplatina 12,5, 25 e 50 μM por 24 horas não foram capazes de causar morte nestas células. O presente trabalho tem como propósito trabalhar com células A172 resistentes à cisplatina. Desta forma, realizamos o tratamento das células A172 com duas concentrações de cisplatina - 50 e 100 μM , por 24 horas. Após este período, as células foram submetidas ao teste de viabilidade celular pelo MTT. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as duas concentrações de cisplatina testadas e o controle (meio de cultura sem soro e sem o quimioterápico) (Figura 4).

4.1.2 – Sulfasalazina

Segundo a literatura, concentrações entre 200 e 300 μM foram suficientes para inibir em torno de 80% da ação do sistema trocador cistina-glutamato (Chung *et al.*, 2005). Assim, foi realizada, nas células A172, uma curva de tratamento padrão de sulfasalazina (de 50 a 300 μM). Após o tratamento, as células foram submetidas ao teste de viabilidade celular pelo MTT quando foram observados valores de absorbância os quais foram então comparados com os valores do controle. Tomou-se a absorbância do controle como 100% de viabilidade. Conforme a figura 5, a viabilidade das células demonstraram variações entre 107% e 89%, porém não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nestes dados. Desta forma, para os experimentos de inibição do sistema trocador cistina-glutamato, foi escolhida a concentração de 300 μM de sulfasalazina

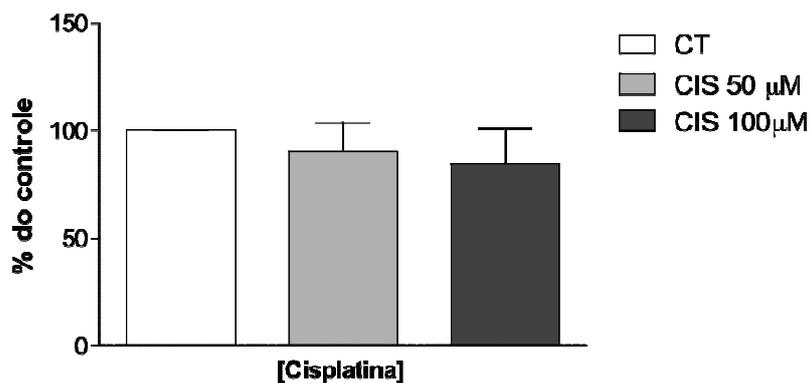


Figura 4 - Ensaio de viabilidade celular após o tratamento com cisplatina. Células A172 foram mantidas em DMEM-F12 adicionado de 10% SFB. Após a confluência as células foram tratadas com 50 e 100 μM de cisplatina (CIS) em DMEM-F12 sem SFB e avaliadas quanto à viabilidade celular por teste de MTT. Os dados foram analisados pelo teste *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. N=6.

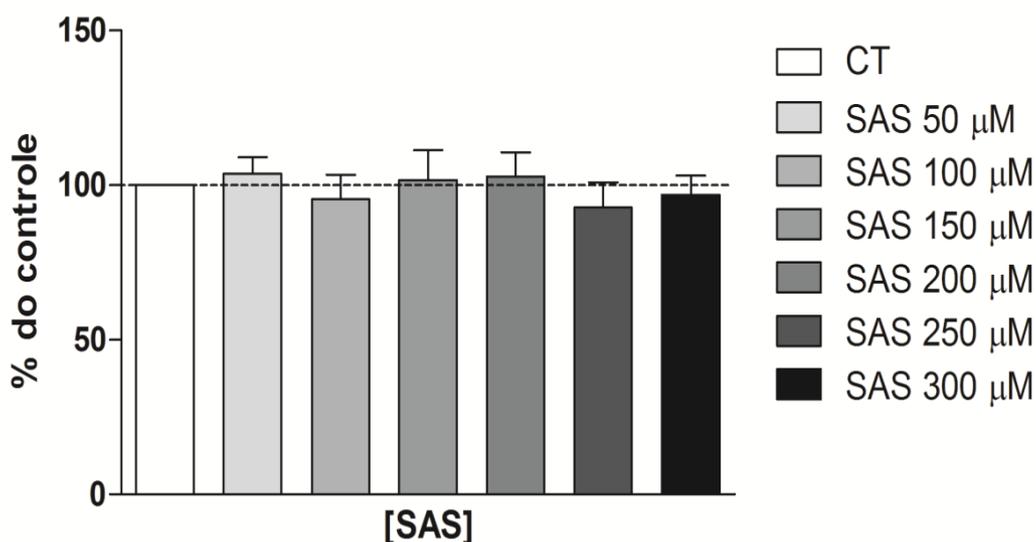


Figura 5 - Ensaio de viabilidade celular após o tratamento com sulfasalazina. Células A172 foram mantidas em DMEM-F12 adicionado de 10% SFB. Após a confluência as células foram tratadas com sulfasalazina (50 a 300 μM) em DMEM-F12 sem SFB e avaliadas quanto à viabilidade celular por teste de MTT. Os dados foram analisados pelo teste *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. N=5.

4.2 - Liberação de Glutamato

Para verificar um possível efeito da cisplatina na liberação de glutamato pelas células de glioblastoma humano A172, estes ensaios foram realizados com o uso de glutamato radioativo (L[³H]-aspartato, análogo do glutamato que não é metabolizado pela célula) e então foram medidos os níveis de radiação nas amostras pelo método de cintilação líquida, conforme materiais e métodos.

Nos tratamentos com cisplatina foi encontrado um aumento estatisticamente significativo e dose-dependente da liberação de glutamato. Em média, a liberação de glutamato aumentou em até 24% após o tratamento com cisplatina 50 μ M e 38% com cisplatina 100 μ M, quando comparados ao controle. Quando as células foram tratadas com sulfasalazina pelo mesmo período que a cisplatina (24 horas) estes valores retornaram aproximadamente aos valores basais do controle com uma discreta diminuição entre 7% e 13%, porém não significativo (Figura 6). Este resultado sugere que o aumento da liberação de glutamato observado ocorre provavelmente pelo trocador cistina-glutamato, uma vez que quando este é inibido, os valores voltam a normalidade, independente da dose de cisplatina.

4.3 - Imunodeteção do trocador cistina-glutamato

Para verificar se a cisplatina poderia exercer efeito na expressão do trocador cistina-glutamato, analisamos o conteúdo proteico da subunidade 4F2hc deste transportador, a qual determina a regulação e localização do heterodímero na membrana. Através de densitometria óptica, não foram observadas diferenças significativas entre o controle e as duas concentrações de cisplatina, quando normalizadas pela β -actina, na expressão desta proteína (Figura 7). Como ocorreu aumento na liberação de glutamato, inibido pela sulfasalazina, a qual inibe especificamente este trocador, o dados obtidos na imunodeteção sugerem que a cisplatina pode estar afetando a atividade do transportador, mas não a sua expressão.

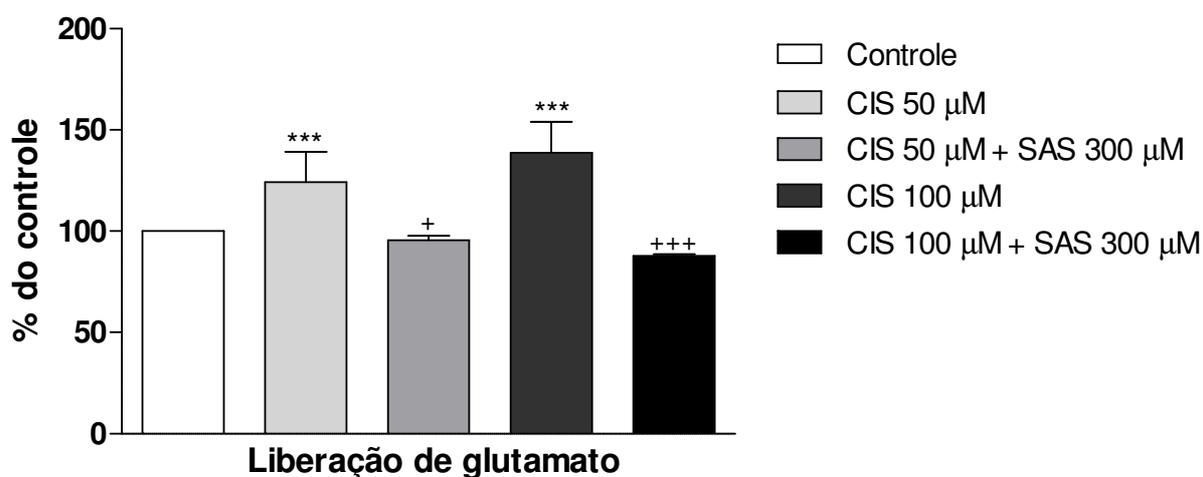


Figura 6 - Ensaio de liberação de glutamato. Células A172 foram tratadas com CIS 50 e 100 μ M por 24 horas e então incubadas com L-[3 H]glutamato e o conteúdo liberado de glutamato avaliado em contador de cintilação líquida, conforme materiais e métodos. A inibição da liberação de glutamato foi realizada com a adição de sulfasalazina pelo mesmo período que a CIS. Os dados foram analisados pelo teste *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$, em relação ao controle. + $p < 0,05$ e +++ $p < 0,001$, quando comparadas CIS e SAS no mesmo ponto. N=4.

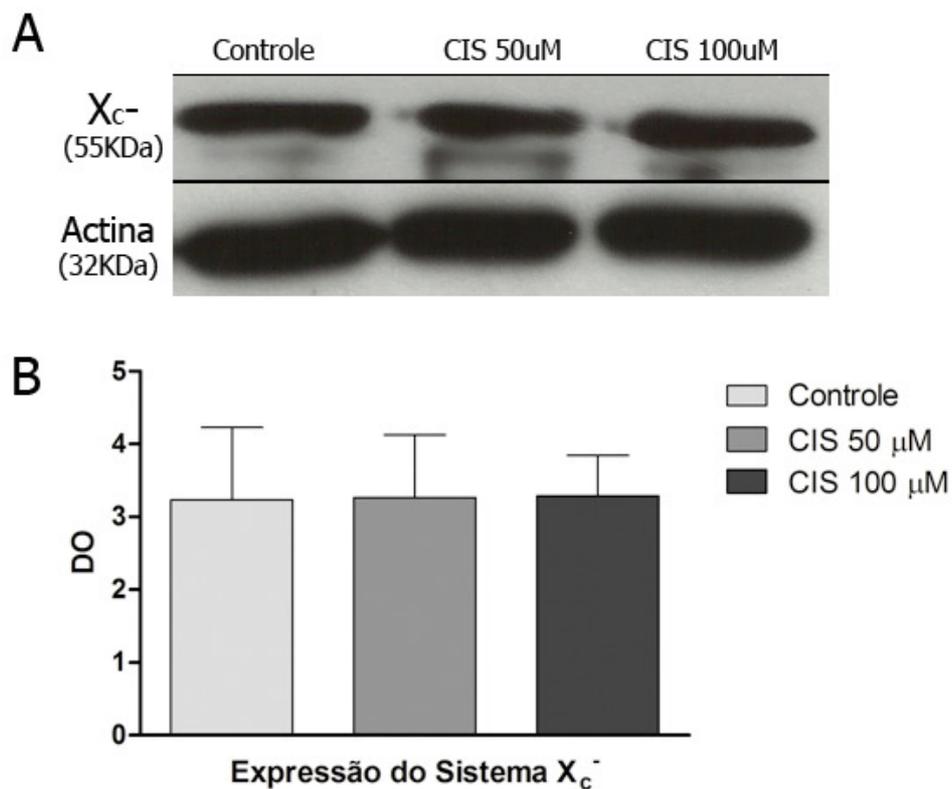


Figura 7 - Análise quantitativa da imunoquantidade do trocador cistina-glutamato por SDS-PAGE. A) Fotografia representativa de *Western blotting* para a subunidade 4F2hc do transportador e para β -actina. **B)** Representação gráfica dos valores obtidos por densitometria óptica (DO) de bandas imunorreativas para a subunidade 4F2hc do transportador, com o uso do *software* Scion Image. Os resultados são expressos como médias \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes, por ANOVA de uma via seguido do teste de Newmann-Keuls.

4.4 – Quantificação da glutathiona intracelular

A inibição do trocador cistina-glutamato por sulfasalazina reverteu a quantidade de glutamato extracelular para níveis próximos ao controle. Esse trocador funciona retirando uma molécula de glutamato de dentro da célula em troca de uma molécula de cistina para dentro da célula. A cistina é precursora da glutathiona, um importante tripeptídeo com atividade antioxidante, então uma maior quantidade de glutamato extracelular poderia indicar maior quantidade de cistina intracelular e por consequência, maior quantidade de glutathiona. Desta forma, foram realizadas as dosagens de glutathiona com o tratamento com cisplatina e também com a sulfasalazina (Figura 8).

Verificamos que o tratamento com cisplatina (50 e 100 μM) não alterou a quantidade de glutathiona intracelular, ao contrário do que era esperado. Por outro lado, quando a sulfasalazina foi adicionada, foi observada uma redução estatisticamente significativa nos níveis de glutathiona intracelular, sugerindo que a depleção de cistina afetou drasticamente a síntese de glutathiona.

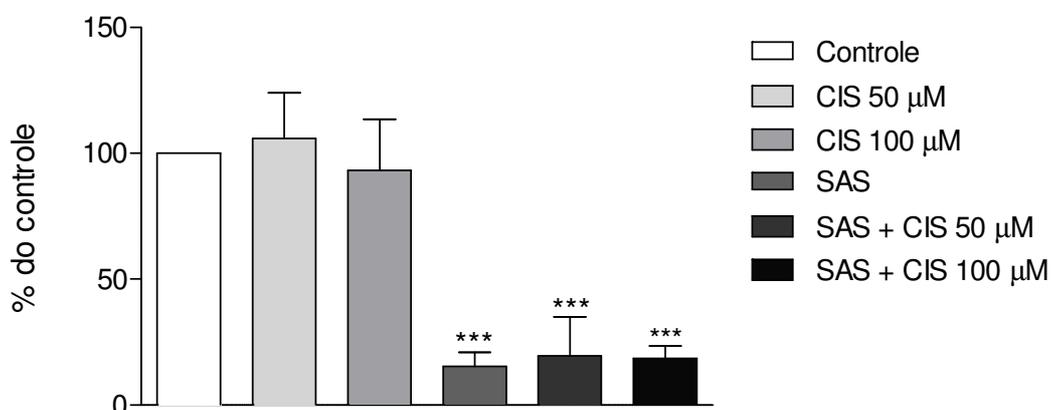


Figura 8 – Determinação da glutathiona intracelular. Células A172 foram tratadas com cisplatina (50 e 100 μM) por 24 horas e então os níveis de glutathiona foram avaliados por método enzimático. A atividade do trocador cistina-glutamato foi inibida com a adição de sulfasalazina pelo mesmo período que a cisplatina. Os dados foram analisados pelo teste *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$, em relação ao controle e a cada ponto de cisplatina, em quatro experimentos independentes.

5 - DISCUSSÃO

Diversos trabalhos tem demonstrado que células de glioma liberam glutamato de maneira exarcebada, levando as células peritumorais à morte e constituindo assim uma via de migração e progressão tumoral (para revisão, ver Sontheimer, 2008). Corroborando com isso, nossos resultados demonstram uma maior liberação de glutamato pelas células de glioblastoma humano A172. Entretanto, verificamos também que a cisplatina, um quimioterápico muito utilizado no tratamento de tumores em geral exerce um importante efeito no transporte glutamatérgico nestas células.

Primeiramente, verificamos que a viabilidade das células A172 não foi alterada de forma significativa nem com o tratamento de cisplatina (50 e 100 μM) e nem com a sulfasalazina (50 a 300 μM). Esses dados são de fundamental importância para nossos experimentos, já que nosso foco é trabalhar com células resistentes ao quimioterápico. Quanto à sulfasalazina, também, foi importante determinar concentrações que não alterassem a viabilidade das células, pois uma diminuição neste processo poderia induzir a falsos resultados no transporte de glutamato.

Em seguida, verificamos um aumento estatisticamente significativo (entre 24% e 38%) e dose-dependente de cisplatina na liberação de glutamato pelas células A172. A fim de averiguar se este aumento ocorreu via trocador cistina-glutamato ou pelos tradicionais transportadores de glutamato como GLAST e GLT-1, foi realizado o tratamento concomitante de cisplatina e sulfasalazina, inibidor específico deste trocador (Chung *et al.*, 2005). Assim, quando as células foram incubadas com o inibidor do trocador cistina-glutamato, a liberação de glutamato por estas células foi revertida aos níveis do controle, apresentando uma tendência à diminuição da liberação (-7% e -13%, para as concentrações de 50 e 100 μM de cisplatina, respectivamente), porém não

estatisticamente significativa. Estes dados sugerem fortemente o envolvimento, pelo menos em parte, do trocador cistina-glutamato, o qual é independente de sódio, em nossos resultados. Entretanto, GLT-1, o qual não foi avaliado neste trabalho, pode ser modulado também pela atividade da bomba de sódio/potássio ATPase. Desta forma, um colapso no gradiente de sódio levaria a condições limitantes de energia, o que poderia promover um funcionamento ineficiente do GLT-1, causando o transporte reverso do glutamato. Isto acontece quando, ao invés de ser captado, o glutamato é eliminado da célula, aumentando assim a concentração deste aminoácido no meio extracelular a níveis tóxicos para as células (Montiel *et al.*, 2005; Maragakis, Rothstein, 2006). Desta forma, o tratamento com cisplatina poderia causar um desbalanço de sódio nestas células e, assim, o transportador GLT-1 poderia também estar envolvido no aumento da liberação de glutamato que observamos. Portanto, GLT-1 será alvo de estudo de próximos experimentos.

Como a cistina é um dos aminoácidos precursores da glutathione, um importante tripeptídeo antioxidante, verificamos se, inibindo especificamente o trocador cistina-glutamato, os níveis intracelulares de glutathione diminuiriam. De fato, observamos uma diminuição muito importante na quantidade de glutathione, comprovando assim a ação do inibidor. Por outro lado, era esperado que o tratamento com cisplatina, o qual aumentou a liberação de glutamato pelas células A172, promovesse também acréscimo da glutathione intracelular. Porém, não foi demonstrado esse aumento da glutathione após o tratamento com cisplatina. Este resultado pode ser explicado pela conjugação química que ocorre entre a cisplatina e a glutathione (Zanellato *et al.*, 2011), o que impossibilita a dosagem correta da mesma. Futuramente outros experimentos de dosagem de cistina ou cisteína serão realizados a fim de elucidar esta dúvida.

Ainda tentando entender o aumento da liberação de glutamato que ocorreu nos experimentos de liberação de glutamato, foram postuladas duas hipóteses: esse aumento

poderia ser decorrente de um aumento da expressão do trocador cistina-glutamato ou de um aumento na atividade deste transportador. Com este fim, foi realizado o ensaio de imunodeteção da subunidade regulatória do trocador (4F2hc). Entretanto, não encontramos diferenças significativas na expressão desta proteína, levando à conclusão de que o aumento na liberação de glutamato não foi resultado de uma maior expressão do sistema trocador na membrana celular e sim de uma acentuação funcional do mesmo.

Diante destes resultados, podemos concluir que, agudamente, a cisplatina não é um bom quimioterapico para o tratamento de gliomas por diversos motivos: (i) ela aumenta a liberação de glutamato pelos gliomas, levando a um aumento da morte das células sadias na área peritumoral por excitotoxicidade provocada pelo glutamato; (ii) ela poderia aumentar (ainda que não demonstrado neste trabalho) os níveis de glutathione intracelular, que é um importante antioxidante que garantiria maior resistência ao tumor; e, (iii) por fim, a cisplatina, apesar do efeito de quebra de DNA, não mata uma quantidade significativa de células cancerosas nas doses testadas, como demonstrado pelos ensaios de viabilidade por MTT. Além disso, a cisplatina, quando administrada via intravenosa não atravessa a barreira hematoencefalica, o que seria um ponto muito negativo para o tratamento de gliomas. Ainda, as doses clinicamente utilizadas para o tratamento de outros tumores apresentam alta nefrotoxicidade por hipocalcemia e hipomagnesemia, levando a distúrbios neuromusculares desde fraqueza até a paralisia completa (BC Cancer Agency, Cancer Drug Manual© - 2008).

Perspectivas futuras para o mestrado, incluem experimentos para avaliar os parâmetros de liberação de glutamato, viabilidade celular, expressão e localização de outros transportadores glutamatérgicos com a cisplatina e com outros quimioterápicos atualmente utilizados no tratamento de gliomas, como a temozolamida e a carmustina, os quais atravessam a barreira hematoencefálica, em um esquema de tratamento crônico.

6 – CONCLUSÕES

Como conclusão deste trabalho, obtivemos informações inéditas e relevantes para o entendimento da ação de quimioterápicos no tratamento dos gliomas e de sua biologia.

Concluimos então que:

- Cisplatina e sulfasalazina não tem um efeito significativo na viabilidade celular nas células de glioma.
- Cisplatina aumenta a liberação de glutamato destas células de modo significativo.
- Sulfasalazina pode compensar o aumento na liberação glutamatérgica promovido pela cisplatina.
- O tratamento com cisplatina não aumentou os níveis de glutathione intracelular, possivelmente pela conjugação entre esta droga e a glutathione.
- Cisplatina não promove um aumento na expressão do trocador cistina-glutamato em células de glioma porém a atividade deste transportador foi aumentada com o tratamento com cisplatina sendo então comprovado pelo uso do inibidor específico deste trocador, que teve sua efetividade comprovada pela diminuição dos níveis de glutathione intracelular.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARA, S., FONTANA, A. (2002) Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* 41:313-318.

ANDERSON, C. M., SWANSON, R. A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and functions physiological. *Glia.* 32:1-14.

AKERBOOM, T. P. E SIES, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77:373-382.

BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.

CHAREST, G, PAQUETTE, B, FORTIN, D, MATHIEU, D, SANCHE, L. (2009). Concomitant treatment of F98 glioma cells with new liposomal platinum compounds and ionizing radiation. *J. Neurooncol.* 97:1887-1893.

CHOI, D.W. (1992). Excitotoxic Cell Death. *J Neurobiol.* 23:1261-1276.

CHUNG, W. K., LYONS, S. A., NELSON, G. M., HAMZA, H., GLADSON, C. L., GILLESPIE, G. Y., SONTHEIMER, H. (2005). Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *J. Neurosci.* 25:7101–7110.

GOODSELL, D. S. (2006). The molecular perspective: cisplatin. *Oncologist.* 11:316-317.

HAYASHI, T. (1954). Effects of sodium glutamate on the nervous system. *J. Med.* 3: 183-192.

HISSIN, P. J., HILF, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 74:214-226.

GUIMARÃES-SOUZA, E. M. (2010). Caracterização dos efeitos receptores metabotrópicos de glutamato no sistema gabaérgico ao longo do desenvolvimento da retina de pinto. Dissertação – Mestrado em Neurociência Universidade Federal Fluminense - Niterói.

KLEIHUES, P, BURGUER, P. C., SCHEITHAUER, B. W. (1993). Histological Typing of Tumours of Central Nervous System. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. *Brain Pathol.* 3:255-268.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t 4. *Nature.* 277:680-685.

LIMA, R. R., COSTA, A. M. R., DE SOUZA, R. D., GOMES-LEAL, W.(2007) Degeneração neuronal secundária e excitotoxicidade. *Rev. Para. Med* 21:27-31.

LYONS, S. A., CHUNG, W. J., WEAVER, A. K., OGUNRINU, T., AND SONTHEIMER, H. (2007). Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Res.* 67:9463-9471.

MARAGAKIS, N.J., ROTHSTEIN, J.D. (2006). Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2:679-689.

MCBEAN, G. J. (2002). Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. *Trends Pharmacol. Sci.* 7:299–302.

MCKENNA, M. (2007). The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in the brain. *J. Neurosci. Res.* 85:3347-3358.

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

MOLZ, S., THARINE, D. C., DECKER, H., TASCA, C. I. (2008). GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1231:113-120.

MONTIEL, T., CAMACHO, A., ESTRADA-SÁNCHEZ, A.M. MASSIEU, L. (2005). Differential effects of the substrate inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) and the non-substrate

inhibitor DL-threo-beta-benzyloxtaspartate (DL-TBOA) of glutamate transporters on neuronal damage and extracellular amino acid levels in rat brain in vivo. *Neurosci.* 133:667-678.

OLNEY J. W. & HO, O. L. (1970). Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate, or cysteine. *Nature* 227:609-611.

PERCY, C., VAN HOLTEN, V., MUNIR, C. (2005). Classificação Internacional de Doenças para Oncologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo.

SANTOS, A. Q., NARDIN, P., FUNCHAL, C., ALMEIDA, L. M. V., JACQUES-SILVA, M. C., WOFCHUK, S. T., GONÇALVES, C. A., GOTTFRIED, C. (2006). Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 453:161–167

SONTHEIMER, H. (2008). A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J. Neurosci.* 105(2):287-295.

STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C., BOGDAHN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G., EISENHAEUER, E., MIRIMANOFF, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352:987-996.

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

TAKEUCHI, A. (1987) The transmitter role of glutamate in nervous systems. *Jpn J Physiol.* 37:559-572.

TANAKA, K. (2000) Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci. Res.* 37:15-19.

VANPOUILLE, C, LE JEUNE, N, KRYZA, D, CLOTAGATIDE, A, JANIER, M, DUBOIS, F, PEREK, N. (2009). Influence of multidrug resistance on F-FCH cellular uptake in a glioblastoma model. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 36:1256-1264.

YE, Z. C., ROTHSTEIN, J. D., SONTHEIMER, H. (1999). Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction–mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine–glutamate exchange. *J. Neurosci.* 19:10767–10777.

ZANELATO, I., BONARRIGO, I., SARDI, M., ALESSIO, M., GABANO, E., RAVERA, M., OSELLA, D. (2011) Evaluation of Platinum–Ethacrynic Acid Conjugates in the Treatment of Mesothelioma. *ChemMedChem* doi: 10.1002/cmdc.201100426.