

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
LABORATÓRIO DE NEUROQUÍMICA-4

Karen Andrinéia de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MODULADORES DA  
NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA,  
ATORVASTATINA E GUANOSINA, EM CÉLULAS DE  
GLIOMA HUMANO A172**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção do grau de  
Doutor em Bioquímica

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Inês Tasca

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia  
Beatriz Nedel

Florianópolis – SC

2017

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

Oliveira, Karen Andrinéia de  
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MODULADORES DA  
NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA, ATORVASTATINA E  
GUANOSINA, EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO A172 / Karen  
Andrinéia de Oliveira ; orientadora, Carla Inês  
Tasca; coorientadora, Cláudia Beatriz Nedel - SC,  
2017.  
191 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

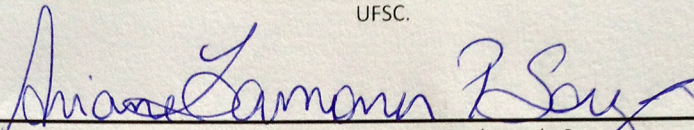
1. Bioquímica. 2. glioma. 3. atorvastatina. 4.  
guanosina. 5. glutamato. I. Tasca, Carla Inês. II.  
Nedel, Cláudia Beatriz. III. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. IV. Título.

**"Avaliação da citotoxicidade de moduladores da neurotransmissão glutamatérgica, torvastatina e guanosina, em células de glioma humano A172"**

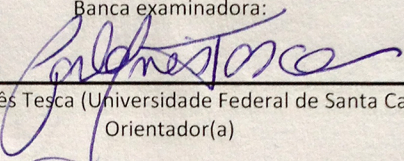
Por

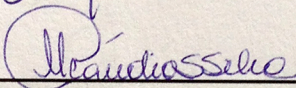
**Karen Andrinéia de Oliveira**

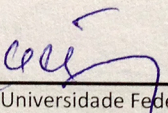
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (008/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

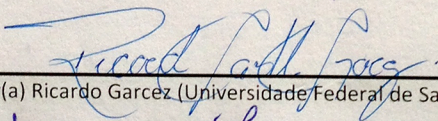
  
Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

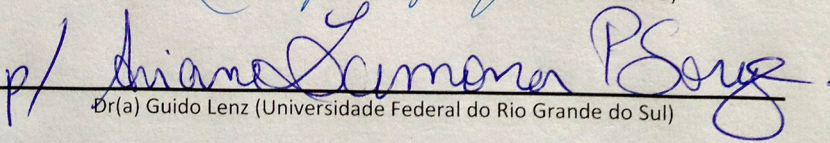
Banca examinadora:

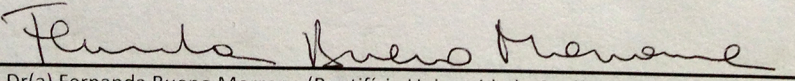
  
Dr(a) Carla Inês Tesca (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

  
Dr(a) Maria Cláudia Santos da Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr(a) Hernán Terenzi (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr(a) Ricardo Garcez (Universidade Federal de Santa Catarina)

p/   
Dr(a) Guido Lenz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

  
Dr(a) Fernanda Bueno Morrone (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul)

Florianópolis, 02 de março de 2017.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Geneci, e ao meu irmão, Mauricio, por todo o apoio, incentivo e valorização das minhas escolhas. Obrigada por acreditarem na minha capacidade e pela parceria. Obrigada pela força e exemplo pra persistir. O amor e a amizade de vocês me inspiram a sempre ser uma pessoa melhor. Amo vocês incondicionalmente;

Agradeço imensamente à professora orientadora, Dr<sup>a</sup> Carla I. Tasca, por todos os ensinamentos, discussões, experiências trocadas e dedicação. Ainda agradeço pela oportunidade de estar em seu laboratório, pela confiança e pela paciência;

Agradeço à minha co-orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Cláudia B. Nedel, pelos ensinamentos passados a mim, confiança depositada, valorização, discussões e pelo incentivo desde o mestrado.

Agradeço ao meu namorado, companheiro, amigo e cúmplice, Thiago, por todo o apoio, paciência, compreensão, carinho e parceria. Agradeço também pelos ensinamentos sobre ilustração que me ajudaram muito neste trabalho.

Agradeço a todos dos colegas e amigos do laboratório de Neuroquímica 4, especialmente aqueles que auxiliaram na execução deste trabalho. Obrigada Flávia, por ser a melhor aluna de iniciação científica que alguém poderia ter, foi um prazer te co-orientar. Obrigada Tharine pela força e ensinamentos no início deste trabalho. Obrigada Caio, Débora e Naiani pela parceria e amizade. Gostaria de agradecer também aos que não fizeram parte da execução do trabalho, mas tornaram o ambiente agradável e incentivaram o desenvolvimento deste trabalho e do grupo;

Agradeço às minhas avós, Verônica e Nita, por serem exemplos de mulheres fortes, que sua perseverança seja espelho pra mim. Agradeço a todos os meus familiares pelo apoio e incentivo e por sempre representarem um porto seguro para mim. Cássia, obrigada por ser sempre minha amiga, além de minha prima;

Aos meus amigos, Bruno Carvalho, Natália Tambellini, Juliana Fabris, que mesmo estando longe estão sempre muito perto. Carolina Heyse, Richardson Schechi, Wagner Martins, Luciana Suzuke, Gianni Mancini pela parceria e força sempre; Obrigada aos meus amigos Paula Daminelli, Rosemeire Bento, Leandro Oliveira, fico feliz que esta cidade tenha me apresentado a vocês. Agradeço também à Rosilaines e a Karolina pela aproximação recente e amizade agradável; Ao Dr. Fernando Melleu, pelas elucubrações estatísticas e sobre a vida;

Agradeço ao professor Dr. Sharbel e a Flora pelas análises de dano ao DNA;

Aos professores do programa de pós-graduação em Bioquímica pelos ensinamentos passados durante o curso e fora dele;

Aos funcionários dos LAMEBs e da secretaria integrada;

À CAPES e CNPQ pelos auxílios financeiros indispensáveis à realização desta Tese.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a execução deste trabalho, de maneira direta ou indireta.

“A vida se encolhe ou se expande na proporção da nossa coragem”

Anais Nin





## RESUMO

Gliomas são tumores altamente agressivos e malignos, de ocorrência no Sistema Nervoso Central. As baixas taxas de sobrevida são relacionadas à alta capacidade proliferativa, migratória e invasiva e consequente resistência a drogas. Dentre os fármacos mais utilizados está a Temozolomida (TMZ). A TMZ é um agente alquilante, eficaz na terapia de diversas neoplasias, entretanto mecanismos de resistência a esse composto acarretam em prognósticos ruins. Assim, o estudo de compostos citotóxicos é substancialmente importante para compreender os mecanismos da doença e o estudo de novas terapias. A Guanosina (GUO) e a Atorvastatina (ATOR) já demonstraram ter potencial modulatório sobre o sistema glutamatérgico. Sendo este um sistema importante no desenvolvimento dos gliomas, compostos que o modulem podem ter potencial citotóxico sobre as células de glioma. Dessa maneira, investigou-se: 1. O potencial citotóxico da ATOR em células de glioma A172 e o efeito desta em processos do desenvolvimento do glioma; 2. O potencial citotóxico da GUO em células de glioma A172, o efeito dela nos processos de desenvolvimento do glioma e mecanismos envolvidos nesse efeito. Os resultados revelam que a ATOR apresenta efeito citotóxico às células de glioma, ainda, ATOR não apresenta efeito citotóxico a astrócitos em concentração similar. ATOR reduz a migração e a proliferação celular do glioma. ATOR induz aumento nos níveis de apoptose e a co-incubação com TMZ acarreta em uma potenciação deste efeito. A ATOR aumenta a presença de organelas vesiculares ácidas, indicando aumento da autofagia. Além disso, a inibição de receptores de glutamato foi capaz de prevenir parcialmente o efeito citotóxico da ATOR, demonstrando uma possível interação desta estatina com tais

receptores na indução do efeito citotóxico. A GUO também demonstrou efeito citotóxico e redução da migração das células de glioma nos mesmos níveis que a TMZ. GUO reduziu a proliferação celular em células de glioma. GUO não alterou os níveis de apoptose, contudo a co-incubação com TMZ mostrou um efeito sinérgico. Esta sinergia foi também observada na diminuição do potencial de membrana mitocondrial e na indução de dano ao DNA. O aumento da liberação de glutamato observado por TMZ foi prevenido com a co-incubação com GUO. A inibição dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> ou A<sub>2A</sub> levou a um bloqueio parcial do efeito citotóxico da GUO. Assim sendo, esta tese contribuiu para demonstrar o efeito antitumoral da ATOR e da GUO, bem como elucidar alguns dos mecanismos de ação envolvidos neste efeito.

## ABSTRACT

Gliomas are a group of tumors considered the most aggressive and malignant type, occurring in the Central Nervous System. Low patients overall survival rates are related to high proliferative, migratory and invasive behavior of these cells and drug resistance. Among the drugs most used to treat this disease is Temozolomide (TMZ). TMZ is an alkylant agent that demonstrated efficacy on several neoplasias treatment, however resistance mechanism to TMZ lead to bad prognoses. In this way, the study of compounds that show cytotoxic potential is considerably relevant to understand the disease mechanisms and to enable the study of new therapies. Guanosine (GUO) and Atorvastatin (ATOR) have already been shown modulatory potential on glutamatergic system of neurotransmission. As this system is so important to glioma development, modulating drugs may show cytotoxic potential against glioma cells. Thus we investigated: 1. ATOR cytotoxic potential to human A172 glioma cells and its effects on development glioma processes. 2. GUO cytotoxic potential to human A172 glioma cells, it effects on development glioma processes and signaling pathways involved. ATOR showed cytotoxic effect to glioma cells in similar levels to TMZ. ATOR did not show cytotoxic effect to normal astrocytes. ATOR decreased migration and proliferation of glioma cells, similarly to TMZ levels. ATOR increases apoptosis and ATOR plus TMZ potentiates this effect. ATOR also increases acid vesicular organelles, indicating induction of autophagy. Furthermore, the ionotropic and metabotropic glutamate receptors inhibition partially prevents ATOR cytotoxic effect, suggesting a possible interaction between ATOR and glutamate receptors on ATOR cytotoxic effect.

GUO also showed cytotoxic effects and reduces migration similar to TMZ levels to human A172 glioma cells. GUO decreases cell proliferation of glioma cells, and this effect is abolished when GUO and TMZ are co-incubated. GUO do not change apoptosis, nonetheless GUO+TMZ show synergistic effect in increasing apoptosis. The same effect was observed on decreasing mitochondrial membrane potential and DNA damage induction. GUO does not change glutamate release. TMZ increases glutamate release and this is prevented by GUO+TMZ co-incubation. A<sub>1</sub> or A<sub>2A</sub> adenosine receptors inhibition partially blockade GUO cytotoxic effect. The A<sub>1</sub>R and A<sub>2A</sub>R blockade reduces cell viability and the A<sub>1</sub>R inhibition and A<sub>2A</sub>R activation do not change cell viability or GUO effect. Therefore, this study contributed to unravel the ATOR and GUO antitumoral effect as well as elucidate some of the mechanisms involved in this effect.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1:</b> Vias de ativação da apoptose.....	26
<b>Figura 2:</b> Processo autofágico de reciclagem de organelas.....	28
<b>Figura 3:</b> Etapas da migração celular.....	30
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de ação da Temozolomida.....	33
<b>Figura 5:</b> Esquema de uma sinapse glutamatérgica.....	36
<b>Figura 6:</b> Estrutura química das estatinas.....	39
<b>Figura 7:</b> Via de biossíntese do colesterol.....	40
<b>Figura 8:</b> Estrutura química da Guanosina.....	43

### CAPÍTULO I

#### ANEXO A

<i>Figure 1: ATOR time-course and concentration-response curves on A172 glioma cells and astrocytes viability.....</i>	65
<i>Figure 2: ATOR and TMZ effects on glioma cells viability.....</i>	65
<i>Figure 3: ATOR and TMZ effects on cell migration.....</i>	66
<i>Figure 4: ATOR effect on cell proliferation.....</i>	67
<i>Figure 5: ATOR and/or TMZ effects on apoptosis levels in A172 cell.....</i>	68
<i>Figure 6: ATOR and TMZ effects on autophagy in A172 glioma cells.....</i>	69
<i>Figure 7: Effects of treatment with ATOR and/or TMZ on glutamate transport and glutamine synthetase (GS) activity.....</i>	70
<i>Figure 8: Evaluation of glutamatergic and purinergic systems on cytotoxic effects of ATOR on A172 glioma cell.....</i>	71
<i>Figure 9: Schematic overview of ATOR effects.....</i>	72

## Dados adicionais do **CAPITULO I**

<b>Figura 1:</b> Avaliação do efeito do tratamento com ATOR no dano ao DNA.....	77
<b>Figura 2:</b> Avaliação do efeito do tratamento com ATOR potencial de membrana mitocondrial.....	78
<b>Figura 3:</b> Avaliação do envolvimento de vias de sobrevivência celular na citotoxicidade induzida pela ATOR.....	80

## **CAPÍTULO II**

### ANEXO A

<i>Figure 1: GUO time-course and concentration-response curves on A172 glioma cells.....</i>	110
<i>Figure 2: GUO and TMZ effects on A172 glioma cells viability....</i>	111
<i>Figure 3: GUO and TMZ effects on A172 glioma cells migration..</i>	112
<i>Figure 4: GUO and TMZ effects on autophagy in A172 glioma cells.....</i>	113
<i>Figure 5: GUO and/or TMZ effects on apoptosis levels in A172 glioma cells.....</i>	114
<i>Figure 6: Effects of treatment with GUO and/or TMZ on glutamate transport and glutamine synthetase (GS) activity in A172 glioma cells.....</i>	115
<i>Figure 7: Evaluation of glutamate transporters and receptors involvement on GUO induced cytotoxic effect in A172 glioma cells.....</i>	116
<i>Figure 8: GUO exerts cytotoxicity on A172 glioma cells via adenosine receptors interaction.....</i>	117
<i>Figure 9: Schematic overview of GUO and GUO plus TMZ association effects on A172 glioma cells.....</i>	118

## ANEXO B

<i>Figure 1: GUO and TMZ effect on DNA damage.....</i>	139
<i>Figure 2: GUO and TMZ effect on A172 cell migration.....</i>	140
<i>Figure 3: GUO and TMZ effects on A172 glioma cell proliferation.....</i>	142
<i>Figure 4: Evaluation of intracellular signaling pathways involved on GUO-induced cytotoxic effect.....</i>	144

## **DISCUSSÃO**

<b>Figura 1:</b> Esquema representando os efeitos da atorvastatina e da guanosina em células de glioma A172.....	164
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína cinase B
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico
AMPK	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
Apaf-1	Fator ativador de protease apoptótica 1
APGN	alquilpurina-DNA-N-glicosilase
ATOR	Atorvastatina
AVO	Organela vesicular ácida
BAX/BAD	Proteínas pró-apoptóticas da família da Bcl-2
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BHE	Barreira hematoencefálica
CaMKII	Proteína cinase dependente de $Ca^{2+}$ /calmodulina
CD133+	Prominina-1, marcador de células tronco
CD40	Proteína transmembrana da família TNF
Cgmp	Guanosina monofosfato cíclico
COM	Centro organizador de microtúbulos
DFF-45	Fator de fragmentação do DNA 45
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAAC	Carreador de aminoácido excitatório
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
FPP	Farnesilpirofosfato
GDP	Guanosina difosfato
GGPP	Geranylgeranylpirofosfato



Gln	Glutamina
GMP	Guanosina monofosfato
GS	Glutamina sintetase
GTP	Guanosina trifosfato
GUO	Guanosina
H89	Dihidrocloreto de N-[2-(p-Bromocinnamilamino)etil]-5-isoquinolinasulfonamida
HMG-CoA	Hidróxi-metil-glutaril-coenzima A
iGluR	Receptor ionotrópico de glutamato
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminal cinase
KA	Cainato
Ki-67	Marcador de proliferação celular
KN-62	Ácido (S)-5- 4-[2-[(5-isoquinolinilsulfonil)metilamino]-3-oxo-3-(4-fenil-1-piperazinil)propil]fenil Isoquinolinesulfonico Ester
LY294002	2-Morfolina-4-il-8-fenilcromen-4-ona
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MEK	Cinase da proteína cinase ativada por mitógeno
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
MGMT	O <sup>6</sup> -metilguanina-DNA metiltransferase
MTIC	5-(3-metiltriazeno)-imidazol-4-carboxamida
Mtor	Proteína alvo de rapamicina em mamíferos
NFκB	Fator de transcrição nuclear κB
NMDA	N-metil-D-aspartato

OMS	Organização Mundial da Saúde
PD98059	2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona
PI3K	Proteína cinase de fosfatidilinositol 3
PARP	Poli ADP ribose polimerase
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
CHE	Cloreto de 1,2-Dimetoxi-N-metil(1,3)benzodioxolo(5,6-c)fenantridinium
Sistema Xc <sup>-</sup>	Trocador cistina-glutamato
SNARE	Proteína de ancoragem vesicular
SNC	Sistema Nervoso Central
TMZ	Temozolomida
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
vGLUT	Transportador de glutamato vesicular

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1.	GLIOMAS.....	21
1.2.	MORTE CELULAR PROGRAMADA.....	23
1.2.1.	Dano ao DNA, Apoptose e Câncer.....	25
1.2.2.	Autofagia e Câncer.....	26
1.3.	PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO EM GLIOMAS.....	29
1.4.	QUIMIOTERAPIA E GLIOMAS.....	32
1.5.	GLIOMAS E GLUTAMATO.....	34
1.6.	POTENCIAIS AGENTES ANTITUMORAIS E MODULADORES DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	38
1.6.1.	Atorvastatina.....	38
1.6.2.	Guanosina.....	42
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>47</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
4.1.	CULTURA CELULAR.....	51
4.2.	TRATAMENTO CELULAR.....	51
4.3.	ENSAIO COMETA.....	52
4.4.	POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ M).....	53
4.5.	VIABILIDADE CELULAR.....	53
4.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	54
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
	Capítulo I.....	57
	ANEXO A - CAPÍTULO I.....	59

<b>Capítulo II.....</b>	<b>81</b>
ANEXO A – CAPÍTULO II.....	83
ANEXO B – CAPÍTULO II.....	119
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>147</b>
<b>6.1. CITOTOXICIDADE E MORTE CELULAR PROGRAMADA..</b>	<b>148</b>
<b>6.2. MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....</b>	<b>153</b>
<b>6.3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....</b>	<b>156</b>
<b>6.4. SISTEMA ADENOSINÉRGICO.....</b>	<b>159</b>
<b>6.5. SINALIZAÇÃO INTRACELULAR.....</b>	<b>161</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>165</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>167</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>169</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. GLIOMAS

Gliomas malignos correspondem a um grupo heterogêneo de tumores, com ocorrência no Sistema Nervoso Central (SNC). Os gliomas podem ter origem por alterações de células gliais ou de seus progenitores (Jiang e Uhrbom, 2012). O tipo celular precursor dos gliomas ainda permanece controverso, porém, há indícios que a origem do glioma maligno seja células positivas para CD133, sendo que este é um antígeno caracteristicamente presente em células tronco tumorais, em cânceres cerebrais (Singh *et al.*, 2004). Contudo, existem estudos que apontam células precursoras de oligodendrócitos ou astrócitos, com alterações em seu funcionamento normal, as quais poderiam engatilhar processos de formação de tumores malignos como gliomas (Persson *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011).

Os gliomas abrangem a maioria dos tumores do SNC, chegando a números próximos de 18.000 novos casos por ano nos Estados Unidos. Sendo cerca de 70% de todas as neoplasias do SNC, podendo variar amplamente em morfologia, localização e resposta a terapias diversas (Ohgaki e Kleihues, 2009; Liu *et al.*, 2011). Uma estimativa do Instituto Nacional do Câncer indica o possível surgimento de 5.440 novos casos de câncer do SNC em homens e 4.830 em mulheres, para o Brasil no ano de 2016 (INCA, 2015). Ainda no Brasil, os dados mais recentes para a incidência de gliomas datam de 1998, indicando o surgimento de 3,35 casos para cada 100.000 habitantes, sendo que óbitos por câncer cerebral correspondem a 4,4% das mortes por câncer (Monteiro e Koifman, 2003).

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, são biologicamente benignos, passíveis de cura por cirurgia, sendo denominados *Astrocitomas pilocíticos*; grau II: considerados malignos, com infiltração precoce nos tecidos adjacentes, bem diferenciado, crescimento lento, podendo progredir para astrocitoma anaplásico, incurável por cirurgia, por exemplo, o *Astrocitoma difuso*, o *Oligodendroglioma* e o *Oligoastrocitoma*; grau III: apresentam 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 prognósticos ruins, como o *Glioblastoma multiforme* (Ohgaki e Kleihues, 2005b; Louis *et al.*, 2007; Ohgaki e Kleihues, 2009; Westphal e Lamszus, 2011).

O glioblastoma multiforme é o glioma de ocorrência mais comum. Este tipo de glioma também é considerado o mais agressivo e sugere-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 12-15 meses para os indivíduos acometidos (Ohgaki e Kleihues, 2009; Liu *et al.*, 2011).

Gliomas apresentam alterações em vias de proliferação e sobrevivência celular. A ativação de fatores de crescimento celular como por exemplo, receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR), através da interação do fator de crescimento epidermal (EGF). Após a ativação de EGFR, o aumento da PI3K (proteína cinase de fosfatidilinositol 3) e ativação de moléculas efetoras como Akt (proteína cinase B) e mTOR (proteína alvo de rapamicina em mamíferos) foram observados em gliomas humanos (Ohgaki *et al.*, 2004).

As mudanças na ativação destas vias levam a um desbalanço no controle de proliferação e sobrevivência, impedindo as células tumorais de entrarem em processos de morte celular programada. Os dois principais tipos de morte celular programada são a apoptose e a morte celular autofágica. Assim, os principais tratamentos utilizados no tratamento dessa doença são a remoção cirúrgica da massa tumoral e uso de tratamentos que induzam tais tipos de morte celular de maneira mais seletiva às células tumorais. Com relação aos estudos atuais, a principal abordagem está baseada nos mecanismos e vias de sinalização celular envolvidas na morte celular programada, bem como compostos capazes de modular esses processos (Bold *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 2009).

## **1.2. MORTE CELULAR PROGRAMADA**

A morte celular programada exerce a regulação de um fino equilíbrio entre a morte e a sobrevivência em tecidos normais. O desequilíbrio nessa homeostase origina alterações que podem culminar em diversas doenças, como câncer, doenças autoimunes e neurodegenerativas. A apoptose e a morte celular autofágica são tipos de

morte celular programada que desempenham papéis essenciais na regulação da sobrevivência, crescimento e desenvolvimento celular, bem como a tumorigênese (Tan *et al.*, 2009).

A apoptose e a autofagia apresentam diferenças morfológicas e bioquímicas em sua ocorrência. A apoptose, morte celular programada tipo I, é caracterizada por uma redução no volume celular, condensação e fragmentação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e perda da adesão com a matriz extracelular (Tan *et al.*, 2009; Ouyang *et al.*, 2012).

A autofagia é usualmente responsável pela reciclagem de organelas celulares desnecessárias ou disfuncionais. É caracterizada pela formação de autofagossomos, que são vesículas de bicamada lipídica, cujos conteúdos são componentes destinados à reciclagem. As hidrolases ácidas lisossomais são responsáveis pela degradação destes componentes (Ferraro e Cecconi, 2007; Tan *et al.*, 2009). Geralmente a ocorrência de autofagia é um processo pró-sobrevivência relacionado a períodos de privação de fatores de crescimento, estresse do retículo endoplasmático ou infecção por patógenos (He e Klionsky, 2009). A morte celular autofágica, ou morte celular programada tipo II, é ativada quando há um bloqueio no processo apoptótico. Os estímulos apoptóticos hiperativam a autofagia e a proteína c-Jun *N*-terminal cinase (JNK) e conseqüentemente há uma indução da morte celular autofágica (Shimizu *et al.*, 2014).



### 1.2.1. Dano ao DNA, Apoptose e Câncer

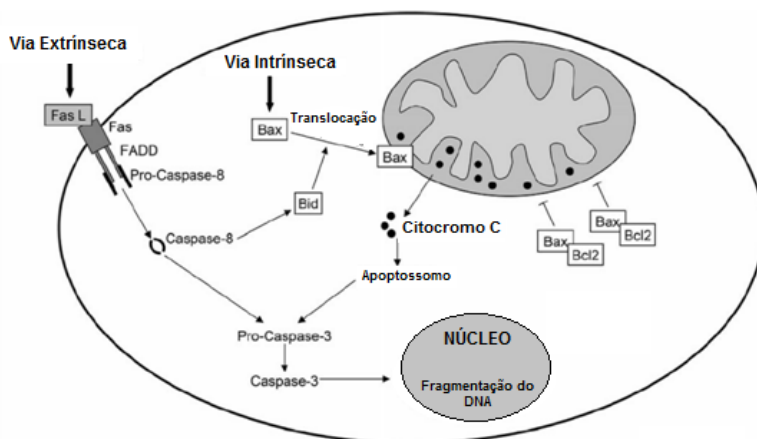
O dano ao DNA é um evento comum durante a vida e pode acontecer de maneira natural como hidrólise espontânea ou durante um estresse natural como a inflamação. O dano ao DNA pode ser corrigido por mecanismos de reparo ou ainda, iniciar processos enzimáticos complexos que podem levar à apoptose, necrose, autofagia e outros tipos de morte celular. Diversos danos ao DNA podem engatilhar o processo de apoptose, como por exemplo: metilação anormal do DNA, N-alquilação de base, adutos no DNA, ligações cruzadas no DNA e rupturas da cadeia dupla do DNA (Wang, 2001; Roos e Kaina, 2006).

Existem duas diferentes vias de ativação da apoptose (Figura 1). A via extrínseca é mediada pela ativação de receptores de morte da família TNF (fator de necrose tumoral). Os ligantes dos receptores da família TNF, Fas e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) interagem com seus respectivos receptores e ativam pró-caspases (8 e 10), que por sua vez levam à ativação de caspase-3 ou caspase-7. Estas, uma vez ativas, clivam proteoliticamente o fator DFF-45 (fator de fragmentação do DNA 45). Tais eventos culminam na fragmentação cromossomal, que é característica da ativação apoptótica (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2009).

A outra via de ativação da apoptose é a via intrínseca, mediada pela mitocôndria, cujo gatilho pode ser radiação gama e dano ao DNA, por exemplo. Como consequência, a membrana mitocondrial se torna permeável e ocorre a liberação do citocromo C. Uma vez liberado ao citosol, o citocromo C se liga à proteína Apaf-1 (fator ativador de protease apoptótica 1) que desencadeia a formação do apoptossomo pelo recrutamento da pró-caspase 9. Esse processo torna ativa a caspase 9,

que por sua vez ativa a caspase 3, desencadeando a apoptose pela mesma via de ativação observada na via extrínseca (Ghobrial *et al.*, 2005).

Alterações na expressão de fatores chave na regulação da cascata apoptótica podem desencadear um desbalanço no crescimento celular originando tumores. Assim sendo, há uma relação próxima entre alterações na manutenção dos níveis normais de apoptose e o surgimento do câncer.



**Figura 6: Vias de ativação da apoptose.** A ativação da apoptose pode ocorrer de duas diferentes maneiras: a via citoplasmática, conhecida como via extrínseca, ativada a partir da interação de ligantes com receptores TNF; ou a via mitocondrial, também chamada de via intrínseca, ativada por estresse intra ou extracelular, cujos sinais convergem para a mitocôndria e subsequente liberação de moléculas pró-apoptóticas (adaptado de Bruin *et al.*, 2008).

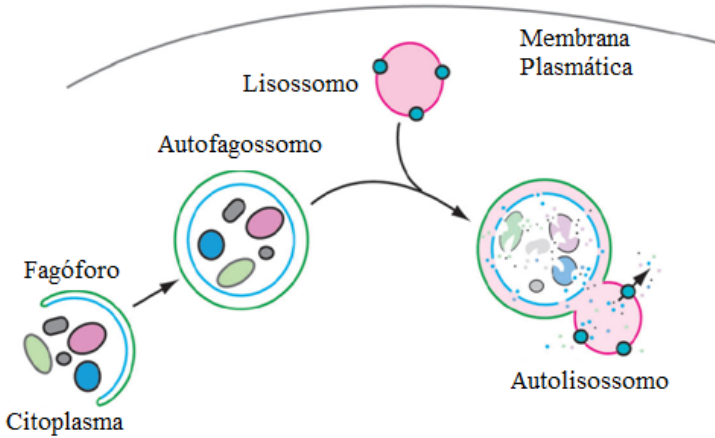
### 1.2.2. Autofagia e Câncer

Como relatado anteriormente, a autofagia é um importante processo para reciclagem de organelas e manutenção da homeostase

celular. Esse evento é essencial para a manutenção entre o catabolismo e o anabolismo celular possibilitando o crescimento celular e o desenvolvimento normal (Tan *et al.*, 2009). A autofagia é uma via de sobrevivência necessária em situações de privação de nutrientes, diferenciação, morte e sobrevivência celular, bem como envelhecimento e prevenção tumoral (Levine e Klionsky, 2004).

Uma vez presentes os fatores de crescimento há uma ativação da PI3K e Akt que levam à ativação da proteína mTOR desencadeando crescimento celular. Eventos estressores podem levar à inibição da mTOR e desencadeiam a parada do ciclo celular, inibição da proliferação e indução à autofagia, entre outros eventos (Gozuacik e Kimchi, 2004). A autofagia pode ser dividida em 4 etapas; a primeira trata-se da nucleação e extensão de membrana abrangendo a porção do citoplasma a ser degradada; a segunda etapa é o fechamento do autofagossomo em um compartimento fechado; a terceira trata-se da fusão deste compartimento com lisossomos; e a quarta fase trata-se da digestão da membrana interna do autofagossomo e do seu conteúdo (Figura 2) (Alberts *et al.*, 2010).

Visto que a autofagia pode ser relacionada com processos de manutenção da integridade celular, existem indícios que correlacionam a presença de autofagia com o desenvolvimento tumoral em suas fases iniciais. Dessa maneira, a inibição desse mecanismo poderia sensibilizar células cancerosas à quimioterapia (Chen *et al.*, 2010). Entretanto, atualmente sabe-se que, quando a apoptose é bloqueada em células de câncer, a morte celular autofágica pode ser acionada como recurso para controle do crescimento tumoral.



**Figura 7: Processo autofágico de reciclagem de organelas.** O processo de autofagia inclui a formação do fagóforo, tratando-se do compartimento inicial de sequestro das estruturas a serem degradadas. Este, por sua vez, se expande a autofagossomo. Por fim ocorre a fusão do autofagossomo com lisossomos e degradação do conteúdo (adaptado de Klionsky *et al.*, 2012).

Assim sendo, a ativação da morte celular autofágica vem sendo considerada uma estratégia no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do câncer (Liu *et al.*, 2010). Além da ativação da morte celular por apoptose e autofagia, existem outros parâmetros que são tipicamente alterados em células cancerosas, como a proliferação e a migração. Estes mecanismos também são alvos de estudo para o tratamento dessa doença.

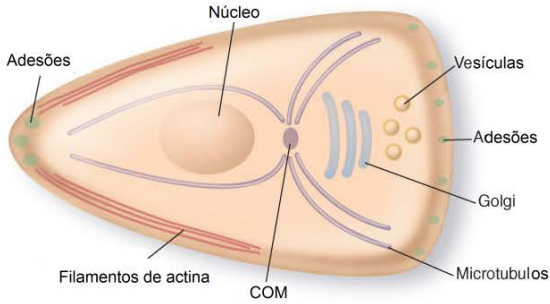
### 1.3. PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO EM GLIOMAS

A proliferação descontrolada e migração anormal são dois dos principais mecanismos envolvidos no crescimento tumoral. O processo de proliferação celular resulta de um aumento no número de células, que é definido pelo balanço entre divisão celular e a diminuição do número de células por morte ou diferenciação celular. Tal processo pode ocorrer de maneira saudável, por meio da regulação do ciclo celular. Já aberrações na regulação de vias que controlam a proliferação e a sobrevivência são indispensáveis para o estabelecimento de todos os tumores (Evan e Vousden, 2001).

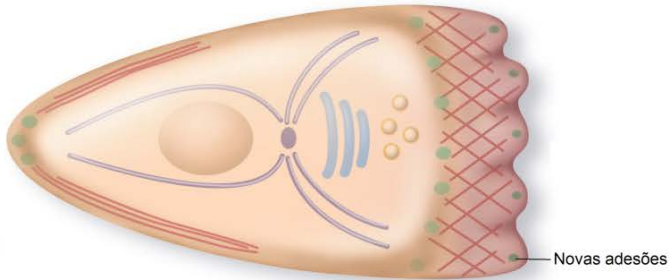
A migração celular é um processo comum a diversos organismos. Está mais intimamente relacionada às fases do desenvolvimento inicial do organismo, direcionando as células para regiões onde originarão os tecidos, durante o desenvolvimento embrionário. Entretanto, a migração é um fenômeno que ocorre durante toda a vida, podendo estar presente na renovação epitelial e reações imunes contra patógenos invasores, por exemplo (Ridley *et al.*, 2003).

Uma vez que uma célula recebe um estímulo migratório, ocorre a polarização e extensão de protrusões na direção da migração. Tais protrusões são direcionadas pela polimerização da actina e estabilizadas pela adesão à matriz extracelular ou células adjacentes via receptores transmembrana ligados ao citoesqueleto de actina. Tais adesões servem como pontos de tração enquanto a célula migra e são despolimerizadas quando estão na região posterior, permitindo o destacamento da célula (Figura 3) (Knight *et al.*, 2000; Ridley *et al.*, 2003).

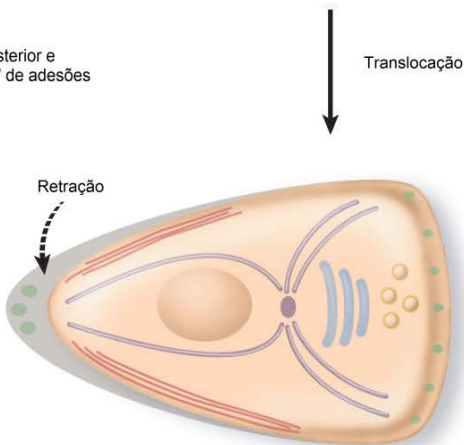
## A. Polarização celular



## B. Protrusão e formação de adesões



## C. Retração posterior e "desmontagem" de adesões



**Figura 8: Etapas da migração celular:** Na primeira fase ocorre a polarização celular. Há o direcionamento de vesículas, organização dos microtúbulos, localização do centro organizador de microtúbulos

(COM) e complexo de Golgi em frente ao núcleo. Então ocorre a formação de protrusões através da estabilização de adesões. Após a translocação, na parte posterior da célula, as adesões são despolimerizadas na medida em que ocorre a retração (adaptado de Ridley *et al.*, 2003).

A migração celular pode estar associada a diversas situações patológicas. Em doenças como osteoporose, doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatoide, esclerose múltipla onde células do sistema imune têm a sua migração aumentada. E ainda no câncer, onde além do recrutamento e migração de células do sistema imune, as células cancerosas apresentam potencial migratório, podendo gerar metástases. (Ridley *et al.*, 2003).

A capacidade de células cancerosas de migrar permite que estas se movam, atinjam os vasos sanguíneos e migrem para diferentes tecidos. Uma vez que, as células alcancem outro tecido pelo qual tenham tropismo, podem iniciar o processo de metástase. Os mecanismos utilizados por células tumorais para realizar a migração celular são muito similares aos mecanismos que ocorrem em células saudáveis. Nesse processo, a célula muda sua estrutura para que possa interagir com o tecido circundante (Friedl e Wolf, 2003).

Em gliomas, já foram descritas alterações em proteínas de adesão, como integrinas e caderinas por exemplo. Além disso, alterações na expressão e ativação de metaloproteinases, que seriam proteases secretadas responsáveis por “liberar” espaço peritumoral para possibilitar o crescimento do tumor. Ainda, alterações na fosforilação de proteínas de sobrevivência, como a Akt e ativação da PI3K estão relacionadas ao aumento na migração em células de glioma (Demuth e Berens, 2004).

Em resumo, proliferação e migração celular são processos fundamentais para a progressão tumoral, bem como para o desenvolvimento de metástases. Desta forma, a identificação de substâncias capazes de modular esses eventos é de extrema importância terapêutica no tratamento do câncer e mais especificamente de gliomas.

#### **1.4. QUIMIOTERAPIA E GLIOMAS**

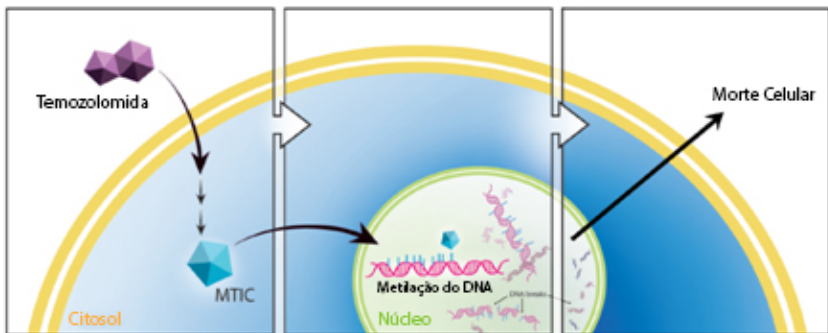
A utilização de terapias associadas no tratamento de gliomas humanos é cada vez mais comum. A ressecção cirúrgica do tumor vem normalmente aliada a terapias adjuvantes, como a quimioterapia e a radioterapia. No caso da quimioterapia, existem importantes fatores limitantes na escolha do quimioterápico 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 (Rainov *et al.*, 2006; Reardon *et al.*, 2006).

Atualmente, dentre os quimioterápicos disponíveis, os mais utilizados no tratamento de gliomas são a Temozolomida, Lomustina, Carmustina e Procarbazina (Stupp *et al.*, 2014). A Temozolomida (TMZ) atua na interrupção da replicação do DNA. A TMZ é um agente alquilante cuja absorção ocorre quando, em pH fisiológico, é espontaneamente hidrolizada em seu metabólito ativo 5-(3-metiltriazeno)-imidazol-4-carboxamida (MTIC). Sua conversão se dá na circulação sanguínea e é independente de vias hepáticas, reduzindo assim a hepatotoxicidade comumente desencadeada pelo uso de quimioterápicos. Tanto a TMZ, quanto seu metabólito MTIC, são



capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica, chegando ao tecido neural. O MTIC causa dano ao DNA pela metilação da guanina O<sup>6</sup>, induzindo a um pareamento incorreto com timina, desencadeando parada no ciclo celular e morte (Newlands *et al.*, 1997) (Figura 4).

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.*, 2013).



**Figura 9: Mecanismo de ação da Temozolomida.** TMZ é convertida intracelularmente a MTIC que metila o DNA, sendo os processos de reparo incapazes de restaurar o DNA, a célula entra em processos de morte (adaptado de Wesolowski *et al.*, 2010).

Mesmo com o uso de terapias concomitantes, os prognósticos dos pacientes permanecem insatisfatórios, sendo que o aumento na sobrevida observada com a quimioterapia está entre 2 a 4 meses (Newlands *et al.*, 1997; Han e Chen, 2015). Os prognósticos ruins destes pacientes após a quimioterapia estão associados aos diversos

mecanismos de resistência a drogas que se observa nesse tipo de câncer. Dentre os mecanismos tipicamente alterados em células de glioma, que lhe conferem resistência, estão as alterações no sistema de neurotransmissão glutamatérgica como a alteração na expressão e na atividade de receptores e transportadores (Ye *et al.*, 1999; Robert e Sontheimer, 2014).

### **1.5. GLIOMAS E GLUTAMATO**

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

A sinalização glutamatérgica ocorre pela interação do glutamato com seus receptores. Os receptores de glutamato estão divididos em duas categorias: os receptores ionotrópicos (iGluR), sendo estes canais iônicos multiméricos, cuja união do glutamato altera sua conformação possibilitando o influxo de íons; e os receptores metabotrópicos (mGluR) que ativam enzimas intracelulares pelo acoplamento a proteínas G (Kew e Kemp, 2005).

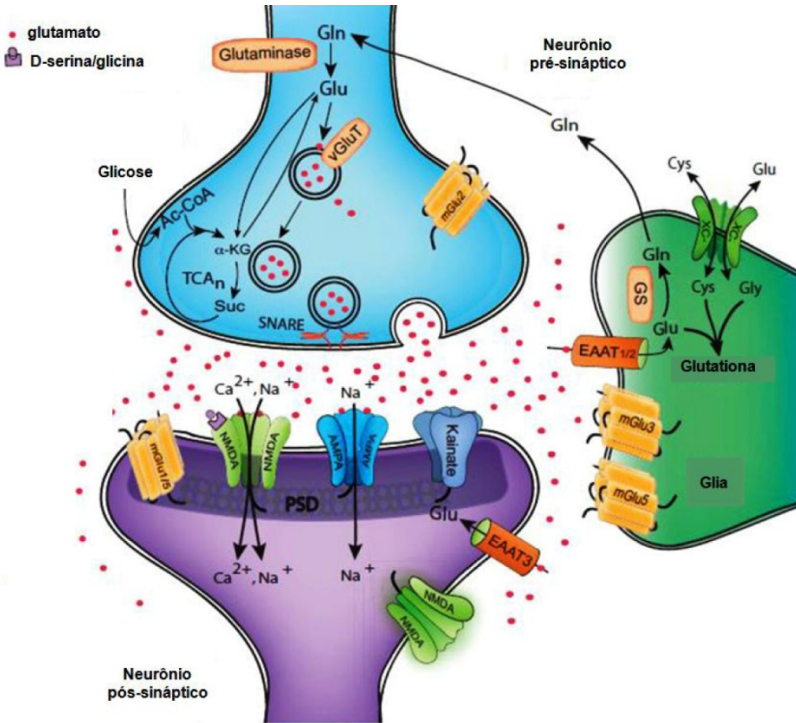
Os receptores ionotrópicos são subdivididos em três classes, cuja nomenclatura foi atribuída de acordo com a seletividade aos seus agonistas: N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico (AMPA) e cainato (KA) (Kew e Kemp, 2005). Com relação aos mGluR, foram identificados 8 tipos, divididos em 3 grupos de acordo com a homologia da sequência de aminoácidos,

seletividade farmacológica e vias de transdução de sinal (Kenny e Markou, 2004).

Existe uma fina regulação dos níveis de glutamato na fenda sináptica, pelo 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). Outra categoria de proteínas realiza o transporte de glutamato através da membrana de maneira dependente de  $\text{Na}^+$ , os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). 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).

Após a captação astrocítica de glutamato, a ativação da enzima astrocitária, glutamina sintetase, promove sua condensação com amônia formando a glutamina. Os astrócitos liberam a glutamina que é captada por neurônios, onde ocorre sua hidrólise, pela ação da glutaminase ativada por fosfato produzindo novamente glutamato, constituindo assim o ciclo glutamato-glutamina (Schousboe e Waagepetersen, 2005; De Groot e Sontheimer, 2011) (Figura 5).

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 Waagepetersen, 2005), caracterizada por uma excessiva ativação dos seus receptores, desbalanço iônico e ativação de vias de morte celular.



**Figura 10: 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 X<sup>c-</sup> 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, cainato; mGluR, receptor metabotrópico de glutamato; EAAT-1, transportador de aminoácido excitatório tipo 1. EAAT-2, transportador de aminoácido excitatório tipo 2; sistema X<sup>c-</sup> trocador de cistina-glutamato; vGLUT, transportadores vesiculares de

glutamato; SNARE, proteína de ancoragem vesicular; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo (adaptado de Pittenger *et al.*, 2011).

A participação do receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA) em eventos de excitotoxicidade já é bem descrita. A excessiva estimulação destes receptores causa um abundante influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , 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).

A ativação de vias de sinalização celular que culminam na modulação de citocinas como o  $\text{TNF}\alpha$ , o fator de transcrição nuclear  $\text{NF}\kappa\text{B}$  e a metaderina, acarretam na diminuição da captação do glutamato, colaborando para promoção da excitotoxicidade. (Noch e Khalili, 2009; Yoo *et al.*, 2011). Já está relatado que o aumento na liberação de glutamato leva à ativação da via da PI3K-Akt iniciando cascatas de invasão e migração celular (Noch e Khalili, 2009). A morte celular peritumoral possibilita a abertura de espaço para crescimento das células de glioma (De Groot e Sontheimer, 2011).

Estudos que demonstram a relação entre a alteração do funcionamento do sistema glutamatérgico e o desenvolvimento de gliomas (Buckingham *et al.*, 2011; Robert e Sontheimer, 2014). A captação de glutamato em gliomas sofre uma importante diminuição em comparação com captação fisiológica observada em astrócitos. Esse decréscimo se deve às alterações nos EAATs, podendo as células de glioma apresentar diminuição ou perda da expressão e alteração da localização subcelular desses transportadores (Ye *et al.*, 1999).

Além de apresentar uma menor captação de glutamato, os gliomas podem liberar glutamato por meio da atividade do trocador cistina-glutamato (sistema X<sub>c</sub><sup>-</sup>), sendo que esse transportador atua captando cistina (precursor do aminoácido cisteína) para o meio intracelular e liberando glutamato. O aumento nos níveis extracelulares de glutamato propicia o aumento da malignidade do tumor, por favorecer a proliferação e a invasão aos tecidos adjacentes, possibilitando a sobrevivência tumoral (De Groot e Sontheimer, 2011).

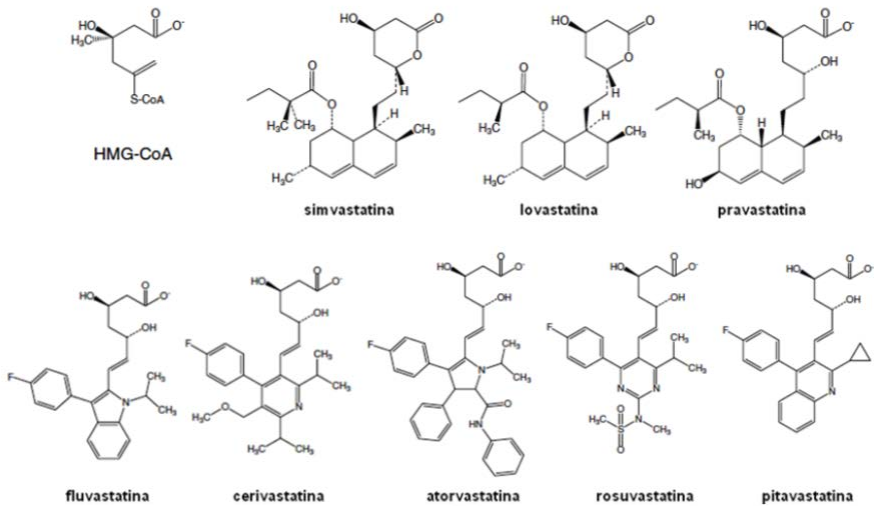
Altas concentrações de glutamato liberado acarretam em morte neuronal por excitotoxicidade glutamatérgica por perda da homeostase intracelular do Ca<sup>2+</sup>, em co-cultura de células de glioma e neurônios hipocâmpais (Ye e Sontheimer, 1999). Além disto, a entrada de cistina no glioma fornece substrato para a síntese de glutatona, um importante antioxidante que aumenta a capacidade de defesa celular (Chung et al., 2005). Portanto, terapias que modulem o sistema glutamatérgico em gliomas, sem danificar o funcionamento do tecido sadio, têm sido sugeridas como uma estratégia alternativa no tratamento da doença.

## **1.6. POTENCIAIS AGENTES ANTITUMORAIS E MODULADORES DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO**

### **1.6.1. Atorvastatina**

As estatinas pertencem à classe de fármacos hipocolesterolemiantes mais prescrita em todo o mundo (Figura 6) (Pannu *et al.*, 2007). O mecanismo de ação das estatinas é baseado na

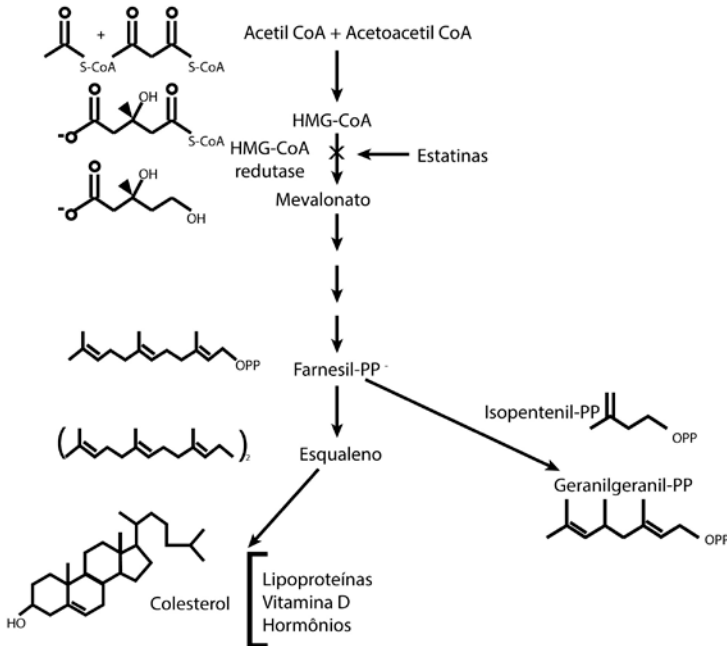
inibição competitiva reversível da enzima marca-passo da via de biossíntese do colesterol, a hidróxi-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, o que acarreta em diminuição da síntese de colesterol pelos hepatócitos (Schachter, 2005).



**Figura 6: Estrutura química das estatinas.** Atualmente existem diversas estatinas completamente sintética, como a fluvastatina, cerivastatina e atorvastatina, por exemplo. Entretanto 3 são derivadas de fungos: simvastatina, lovastatina e pravastatina pravastatina (Shitara e Sugiyama, 2006).

A inibição de HMG-CoA redutase leva à inibição da síntese de um número importante de intermediários da via de biossíntese do colesterol como o farnesilpirofosfato (FPP) e o geranylgeranylpirofosfato (GGPF) (Figura 7), o que pode por sua vez, induzir mudanças pós-traducionais em uma série de proteínas citosólicas como as proteínas Rho e Ras da família de proteínas G de baixo peso molecular (Goldstein e Brown, 1990; Van Aelst e D'souza-Schorey, 1997; Liao e Laufs,

2005). Portanto, apesar das estatinas serem largamente utilizadas no tratamento das hipercolesterolemias, elas são capazes de desencadear efeitos pleiotrópicos independentes de sua capacidade em modificar a concentração de lipídios (Stein, 2002). Entre eles têm sido relatados, efeitos antiinflamatórios (Yoshida, 2003), vasculares (Rader, 2003) e efeitos sobre doenças neurodegenerativas (Miida *et al.*, 2007; Piermartiri *et al.*, 2009; Piermartiri *et al.*, 2010; Ludka *et al.*, 2016).



**Figura 7: Via de biossíntese do colesterol:** o efeito das estatinas em inibir a produção do colesterol e de diversos intermediários da via, pela inibição da HMG-CoA redutase (adaptado de Liao e Laufs, 2005).

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas descritos em câncer estão relacionados à inibição da proliferação, metástase e angiogênese bem



como indução de estresse oxidativo (Licarete *et al.*, 2015). Estudos sugerem que o uso de estatinas pode reduzir o risco de câncer colorretal em homens (Clancy *et al.*, 2013), câncer de esôfago (Singh *et al.*, 2013), bem como prejudicando o crescimento de melanoma em modelo animal (Favero *et al.*, 2010). Existem também, evidências de sua ação reduzindo mediadores inflamatórios e moléculas de adesão endotelial na anemia falciforme (Adam e Hoppe, 2013).

Diversos estudos relatam a ação de estatinas em células de glioma humanos. A lovastatina inibe a proliferação de células de linhagens de glioma humano como A172, U87, U251 e ainda em culturas primárias de glioblastomas humanos, de maneira dependente de concentração, por indução de apoptose (Jones *et al.*, 1994; Bouterfa *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2004). Ainda, cerivastatina é capaz de inibir a migração celular de linhagens de gliomas humanos U251 e U87MG (Obara *et al.*, 2002). De maneira similar, a simvastatina é capaz de inibir o crescimento e a migração celular, além de ativar cascatas apoptóticas em modelos de glioma *in vitro* (Gliemroth *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2009). A associação de atorvastatina com lovastatina ou proglitazona acarreta em altos níveis de morte celular em células de gliomas humanos, sendo que atorvastatina associada à proglitazona aumenta a ativação de caspase-3 nessas células (Tapia-Pérez *et al.*, 2011).

Apesar das estatinas compartilharem o mecanismo de ação, existe diferenças quanto à atividade e farmacocinética destes fármacos. A atorvastatina é uma estatina sintética e lipossolúvel, que se liga a proteínas plasmáticas e tem seletividade hepática quanto a inibição da HMG-CoA redutase (Schachter, 2005). A lactonização deste composto permite a transformação da atorvastatina a uma lactona, que pode por

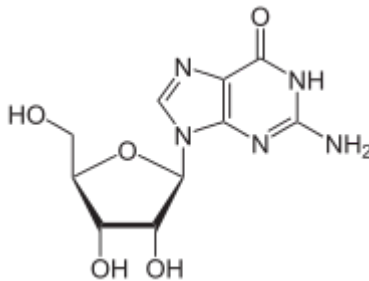
sua vez atravessar a barreira hematoencefálica (Kantola *et al.*, 1998; Jacobsen *et al.*, 2000). Em geral, os efeitos colaterais mais frequentes dessa estatina, como fadiga muscular, desconforto abdominal, mal-estar e febre, são bem tolerados (Schachter, 2005) e uma grande quantidade de dados clínicos tem demonstrado a segurança da utilização de altas doses de atorvastatina (Schwartz *et al.*, 2001; Koren *et al.*, 2004).

Estudos têm apontado para uma capacidade da atorvastatina em modular a transmissão glutamatérgica. A atorvastatina protege de neurônios corticais da morte celular induzida por glutamato, de maneira independente da ação inibitória da HMG-CoA redutase (Bösel *et al.*, 2005). Ainda, já foi demonstrado que estatinas são capazes de proteger neurônios da excitotoxicidade induzida pela ativação de receptores NMDA (Zacco *et al.*, 2003). Apesar do mecanismo de ação não ser bem esclarecido, a atorvastatina é um modulador da transmissão glutamatérgica e parece atuar pelo bloqueio da ativação dos receptores NMDA (Wang *et al.*, 2009; Gutierrez-Vargas *et al.*, 2014) desta forma, um potencial agente para avaliação dos efeitos como possível estratégia terapêutica em gliomas.

### 1.6.2. Guanosina

Uma molécula endógena que vem demonstrando efeitos biológicos importantes é a guanosina (Figura 8), o nucleosídeo da guanina que atua como molécula de sinalização intercelular no SNC. Além do seu papel intracelular, como precursor dos nucleotídeos da guanina, diversos estudos mostram que a guanosina exerce efeitos extracelulares, como um agente neuroprotetor (Rathbone *et al.*, 2008) e estimulador da regeneração nervosa (Jiang *et al.*, 2003). Ainda, a

guanosina previne convulsões e a toxicidade induzida por drogas que superestimulam o sistema glutamatérgico em camundongos (Schmidt *et al.*, 2000; Lara *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2005), além de possuir efeito antinociceptivo e ansiolítico (Vinadé *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009). Além disso, a guanosina previne a excitotoxicidade glutamatérgica induzida pela privação de oxigênio e glicose e pela administração de peptídeo  $\beta$ -amiloide, modelos de isquemia e da doença de Alzheimer, respectivamente, através do aumento da captação de glutamato pelos transportadores não-neuronais (Frizzo *et al.*, 2002; D'alimonte *et al.*, 2007; Dal-Cim *et al.*, 2011). D'Alimonte *et al.* (2007) também demonstraram que a guanosina é capaz de diminuir a expressão e função de receptores CD40, receptores celulares associados a eventos inflamatórios. Além disso, em fatias hipocâmpais, a guanosina não apresenta toxicidade às células neurais mesmo quando em alta concentração (Molz *et al.*, 2009).



**Figura 8: Estrutura química da Guanosina:** a guanosina é um nucleosídeo que compreende uma guanina ligada a uma ribose por uma ligação glicosídica. A guanosina pode ser fosforilada a guanosina monofosfato (GMP, guanosina monofosfato cíclico (cGMP), guanosina difosfato (GDP) e guanosina trifosfato (GTP) (Lanznaster *et al.*, 2016).

Um dos principais mecanismos a que se atribui o efeito neuroprotetor da guanosina é a sua capacidade de aumentar a captação

de glutamato. Este efeito já foi demonstrado em cultura de astrócitos e fatias cerebrais submetidas a situações excitotóxicas, sugerindo que a guanosina possui um papel regulatório sobre os níveis extracelulares de glutamato, mantendo-o em níveis subtóxicos (Gottfried *et al.*, 2002; Thomazi *et al.*, 2004; Frizzo *et al.*, 2005; Dal-Cim *et al.*, 2011; Lanznaster *et al.*, 2016). Além dos efeitos neuroprotetores da guanosina, há uma série de evidências demonstrando seus efeitos tróficos, como neuritogênese ou proliferação celular (Rathbone *et al.*, 1999). Em coculturas de astrócitos e neurônios cerebelares, o tratamento dos astrócitos com guanosina promove uma reorganização de proteínas da matriz extracelular. Tais efeitos tróficos ocorrem pela ativação de vias de sobrevivência celular como MAPK/ERK, CaMKII, PKC, PI3K e PKA (Decker *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado a interação da guanosina com receptores de adenosina em diversos efeitos. A inibição do receptor A<sub>1</sub> de adenosina foi capaz de inibir o efeito antinociceptivo da guanosina (Schmidt *et al.*, 2010). Ainda, estudos sugerem que o efeito neuroprotetor da guanosina está relacionado com a ativação do receptor A<sub>1</sub> e inativação do receptor A<sub>2A</sub> de adenosina, possivelmente através de uma oligomerização destes receptores (Ciruela *et al.*, 2006; Ciruela, 2013; Dal-Cim *et al.*, 2013). O efeito neuroprotetor da guanosina depende da ativação de cascatas intracelulares envolvidas em processos de sobrevivência e crescimento celular, como as vias da PI3K/Akt e MAPK (Molz *et al.*, 2011; Dal-Cim *et al.*, 2012).

Ainda que os mecanismos de ação da guanosina não tenham sido completamente elucidados, diversos estudos têm demonstrado efeito protetor e efeito antitumoral. A guanosina induz diferenciação,

melanogênese e diminuição da motilidade em células de melanoma (Naliwaiko *et al.*, 2008). Além disso, a guanosina é capaz de aumentar o efeito antitumoral da acriflavina em modelo de carcinoma de Erlich (Kim *et al.*, 1997).



## 2. JUSTIFICATIVA

Os tratamentos utilizados em pacientes acometidos por gliomas, como a ressecção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia não produzem melhora satisfatória nos prognósticos e tempo de sobrevivência dos pacientes. Ainda, os quimioterápicos clássicos para o tratamento dessa doença exibem uma vasta gama de efeitos colaterais, prejudicando a qualidade de vida do paciente.

A temozolomida é um quimioterápico de uso clássico no tratamento de gliomas, que atua impedindo a replicação do DNA, mas já foi observado que seu uso não é capaz de elevar a sobrevivência de pacientes de maneira satisfatória. Não há estudos que relacionem os mecanismos de resistência à temozolomida com a atividade glutamatérgica alterada em gliomas.

Atualmente existem diversos estudos em andamento sobre terapias associadas, entre quimioterápicos de uso clássico e substâncias com ações potenciais na diminuição da proliferação e ativação do processo apoptótico. Entretanto, as terapias associadas em uso clínico atual, ainda não apresentam melhora dos prognósticos para pacientes acometidos com gliomas.

Em câncer de pulmão, a guanósina foi capaz de reduzir a população celular rica em células tronco (Su *et al.*, 2010). Apesar da excitotoxicidade glutamatérgica e a presença de eventos inflamatórios em gliomas já serem bem evidentes, ainda não existem estudos publicados sobre os efeitos da guanósina em gliomas.

O uso de estatinas reduzindo a incidência de câncer, bem como diminuindo o crescimento tumoral, já vem sendo descrito por estudos

nos últimos anos. Os efeitos pleiotrópicos da atorvastatina têm sido relacionados à modulação do sistema glutamatérgico, em especial à modulação dos receptores NMDA, principal responsável pela excitotoxicidade glutamatérgica, proeminente em gliomas.

Visto que gliomas apresentam alterações no sistema glutamatérgico, estudos sobre o efeito de quimioterápicos neste sistema, bem como o efeito de substâncias adjuvantes que possam apresentar efeitos sobre o funcionamento do sistema glutamatérgico em gliomas, podem elucidar mecanismos alvo para potenciais tratamentos da doença.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito isolado e da associação do quimioterápico Temozolomida (TMZ) com os compostos moduladores do sistema glutamatérgico Atorvastatina ou Guanosina, sobre a sobrevivência, proliferação e migração celular, transmissão glutamatérgica e vias de sinalização e morte celular na linhagem de glioma A172.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

I. Avaliar possíveis efeitos do tratamento com Atorvastatina sobre alterações na viabilidade celular, migração celular, parâmetros glutamatérgicos e indução de morte celular programada em cultivo de glioma humano A172, comparativamente com os efeitos da Temozolomida;

II. Avaliar possíveis efeitos do tratamento associado de Temozolomida e Guanosina sobre alterações na viabilidade celular, migração celular, parâmetros glutamatérgicos e indução de morte celular programada em cultivo de glioma humano A172.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os materiais e os métodos utilizados para a realização dos experimentos encontram-se nos respectivos capítulos da mesma, descritos no corpo dos artigos científicos que compõem esta tese na seção de resultados. Os métodos adicionais encontram-se a seguir.

### **4.1. CULTURA CELULAR**

As células da linhagem de glioblastoma humano A172 (ATCC, 2013; gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Guido Lenz, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil) foram cultivadas em DMEM-F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA)/10% SFB (Cultilab), frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para análises bioquímicas, quando atingida à confluência, as células foram tripsinizadas (Trypsina/EDTA, 0.05%; Gibco) e plaqueadas em placas de 24 ou 96 poços (3.5 x 10<sup>5</sup> ou 0.5 x 10<sup>5</sup> células por poço, respectivamente).

### **4.2. TRATAMENTO CELULAR**

As células foram plaqueadas em placas de 24 ou 96 poços. Após a confluência, foram tratadas com ATOR (10 µM), TMZ (500 µM), ou ATOR (10 µM) + TMZ (500 µM) durante 48 horas. Para melhor compreender o mecanismo da ação citotóxica da ATOR foram empregados inibidores de vias de sobrevivência, como um estudo de abordagem farmacológica. Tais inibidores foram pré-incubados por 30 minutos antes da adição da ATOR e foram mantidos por 48 horas de tratamento. As drogas utilizadas foram: inibidor da proteína cinase A

(PKA) – Dihidrocloreto de N-[2-(p-Bromocinnamilamino)etil]-5-isoquinolinasulfonamida (H89 - 3  $\mu\text{M}$ ); inibidor da proteína cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMKII) – Ácido (S)-5- 4-[2-[(5-isoquinolinilsulfonil)metilamino]-3-oxo-3-(4-fenil-1-piperazinil)propil]fenil Isoquinolinesulfonico ester, (KN-62 - 10  $\mu\text{M}$ ); inibidor da cinase da proteína cinase ativada por mitógeno (MEK) – 2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona (PD98059 - 10  $\mu\text{M}$ ); inibidor da proteína cinase C (PKC) – Cloreto de 1,2-Dimetoxi-N-metil(1,3)benzodioxolo(5,6-c)fenantridinium (Quelerritina – CHE - 3  $\mu\text{M}$ ); o inibidor da fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase (PI3k) – 2-Morfolina-4-il-8-fenilcromen-4-ona (LY294002 - 10  $\mu\text{M}$ ); inibidor da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) – rapamicina (RAP - 1  $\eta\text{M}$ ). Os grupos controle foram incubados somente com meio de cultivo por 48 horas.

### 4.3. ENSAIO COMETA

O protocolo de cometa sob condições alcalinas foi usado segundo Singh et al. (Singh et al., 1988), de acordo com os guias gerais para aplicação *in vitro* (Tice et al., 2000). As lâminas foram fixadas com prata para avaliação do dano ao DNA (Nadin et al., 2001). Foram analisadas 100 células por grupo em microscópios óptico em aumento de 200 vezes. As células foram analisadas visualmente e a elas foi atribuído uma pontuação de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) de acordo com a intensidade da cauda (tamanho e formato).

#### **4.4. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ M)**

Após o tempo de tratamento as células foram incubadas com um corante fluorescente mitocondrial, a tetrametilrodamina etil ester (TMRE, 10 nM), durante 30 minutos a 37°C (Egea et al., 2007) para analisar o potencial de membrana mitocondrial decorrente do tratamento com ATOR. A intensidade de fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de 550 nm de excitação e 590 nm de emissão. O carbonil cianido p-trifluorometoxi fenilhidrazona (FCCP), um desacoplador mitocondrial, foi utilizado como controle positivo da emissão de fluorescência.

#### **4.5. VIABILIDADE CELULAR**

Para estudar o efeito da ATOR em vias de sobrevivência celular a viabilidade celular foi avaliada pela capacidade de reduzir o sal de MTT (3-(4,5-Diametiliazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium como descrito (Mosmann, 1983). Nesse ensaio, as células viáveis convertem o sal hidrossolúvel de MTT em formazana púrpura, insolúvel em água. Assim sendo, a formação da formazana é proporcional ao número de células viáveis e é analisado por densidade óptica. As células foram incubadas com MTT (0.2 mg/mL) em PBS por 2 horas a 37°C. A formazana produzida foi solubilizada com dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância da solução foi medida em leitor de ELISA (Multileitora Infinte M200 TECAN) a 550 nm.

#### **4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. O software utilizados para tal e para confecção dos gráficos foi o GraphPad Prism 4.0, considerando o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão divididos em capítulos seguindo a distribuição abaixo:

- Capítulo I: Avaliação dos mecanismos citotóxicos da atorvastatina em células de glioma humano A172 e estudo do envolvimento dos sistemas glutamatérgico e adenosinérgico.
- Capítulo II: Estudo do efeito citotóxico da guanosina e envolvimento dos sistemas adenosinérgico e glutamatérgico e da associação com temozolomida em células de glioma humano A172.





## CAPÍTULO I

### *Avaliação dos mecanismos citotóxicos da atorvastatina em células de glioma humano A172 e estudo do envolvimento dos sistemas glutamatérgico e adenosinérgico.*

Este capítulo apresenta os resultados relacionados ao objetivo específicos I desta tese.

Os resultados referentes ao efeito citotóxico da atorvastatina e o envolvimento do sistema glutamatérgico estão apresentados como o Anexo A do Capítulo I, que exhibe o artigo científico intitulado “*Atorvastatin promotes cytotoxicity and reduces migration and proliferation of human A172 glioma cells*” publicado no periódico *Molecular Neurobiology*

Os resultados relativos ao efeito da atorvastatina sobre o dano ao DNA e potencial de membrana mitocondrial e a avaliação do envolvimento de vias de sinalização intracelular no efeito da atorvastatina, estão apresentados na sequência.



**ANEXO A - CAPÍTULO I**



# Atorvastatin Promotes Cytotoxicity and Reduces Migration and Proliferation of Human A172 Glioma Cells

Karen A. Oliveira<sup>1,2</sup> · Tharine Dal-Cim<sup>3</sup> · Flávia G. Lopes<sup>4</sup> · Fabiana K. Ludka<sup>1,2,5</sup> · Cláudia B. Nedel<sup>3,4</sup> · Carla I. Tasca<sup>1,2,3</sup>

Received: 4 October 2016 / Accepted: 25 January 2017  
© Springer Science+Business Media New York 2017

**Abstract** Malignant gliomas have resistance mechanisms to chemotherapy that enable tumor invasiveness and aggressiveness. Alternative therapies in cancer treatment, as statins, have been suggested to decrease proliferation, inhibit cell migration, and induce cell death. The aim of this study was to evaluate the effect of atorvastatin (ATOR) on cell viability, migration, proliferation, apoptosis, and autophagy in A172 human glioma cells. Temozolomide (TMZ), a chemotherapeutic used to glioma treatment, was tested as a comparison to cytotoxic effects on gliomas. Cell viability was also assessed in primary culture of cortical astrocytes. ATOR treatment (0.1 to 20  $\mu$ M) did not alter astrocytic viability. However, in glioma cells, ATOR showed cytotoxic effect at 10 and 20  $\mu$ M concentrations. TMZ (500  $\mu$ M) reduced cell viability similarly to ATOR, and drug association did not show additive effect on cell viability. ATOR, TMZ, and their association decreased cell migration. ATOR also decreased glioma cell proliferation. ATOR increased apoptosis, and TMZ association showed a potentiation effect, enhancing it. ATOR and TMZ treatment increased acidic vesicular organelle (AVO) presence in A172 cells, an indicative of autophagy. ATOR effect of reducing A172 cell viability did

not alter glutamate transport and glutamine synthetase activity, but it was partially prevented through antagonism of ionotropic and metabotropic glutamate receptors. Our data shows a cytotoxic effect of ATOR on glioma cells, whereas no toxicity was observed to astrocytes. ATOR showed similar cytotoxic effect as TMZ to glioma cells, and it may be a safer drug, regarding side effect induction, than chemotherapeutic agents.

**Keywords** Atorvastatin · Glioma cells · Temozolomide · Cytotoxicity · Glutamate

## Introduction

Malignant gliomas are a heterogeneous tumor group, and they are considered the harshest type of brain cancers, originating from astrocytic neoplastic transformation. It comprises about 70% of all central nervous system (CNS) neoplasias, with 18,000 new cases discovered every year. Gliomas differ widely in morphology, location, and therapy responses [1, 2]. The treatment consists of tumor resection usually combined with therapies, such as chemotherapy and radiotherapy. Chemotherapy shows substantial limiting factors for choosing the use of drug, such as blood-brain barrier (BBB) permeability to drugs and tumor heterogeneity. These issues define cancer responsiveness to therapy [3, 4]. Among the most recently used drugs is temozolomide (TMZ) which interrupts DNA replication. TMZ treatment shows potential efficacy in early diagnosed glioma treatment [5]. However, even with combined treatments, the survival rates remain unsatisfactory, being around 12 to 15 months.

Statins, the most prescribed class of hypocholesterolemic drugs worldwide, are being reported as potential drugs in glioma treatment [6]. Their mechanism of action to reduce cholesterol synthesis is based on reversible competitive inhibition of the pacemaker enzyme of cholesterol biosynthetic pathway,

✉ Carla I. Tasca  
carla.tasca@ufsc.br

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, Brazil  
<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040900 Florianópolis, Brazil  
<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, Brazil  
<sup>4</sup> Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil  
<sup>5</sup> Curso de Farmácia, Universidade do Contestado, Canoinhas, Brazil

hydroxymethyl-glutaryl (HMG)-CoA reductase [7]. However, statins are able to trigger pleiotropic effects independently of their capability in changing lipid levels [8]. Statins have been shown to display antiinflammatory [9], vascular [10], and neuroprotective effects [11–13].

Focusing in statin effects on glioma cells, it has been shown that lovastatin inhibits human glioma cell proliferation in a concentration-dependent way, by inducing apoptosis [14–16]. Further, cerivastatin inhibits cell migration in human glioma lines [17], and simvastatin has been shown to inhibit cell growth and migration and to activate apoptotic cascades in *in vitro* glioma models [18, 19]. Despite that statins share similar mechanisms of action on HMG-CoA reductase inhibition, there are differences in their activity and pharmacokinetics. Atorvastatin (ATOR) is a synthetic and lipophilic statin, able to cross the BBB [7, 20, 21]. This statin suppresses invasion and migration in human glioma cells (U87, U 138, and LN 405) and its combination with lovastatin or pioglitazone increases cell death [22, 23].

Several researches show the relationship between changes in the glutamatergic system and glioma development. Glutamate uptake into gliomas is significantly reduced, probably due to a decreased expression and activity of excitatory amino acid transporters when compared to astrocytes [24]. In addition to lower glutamate uptake, gliomas release it through a cystine-glutamate exchanger ( $Xc^-$  system) activity [25]. Studies evaluating the neuroprotective effect of ATOR suggest its capacity of modulating the glutamatergic transmission, presenting an antagonist-like effect over glutamate receptors [26], or modulating glutamate transport. ATOR treatment prevents the decreased glutamate uptake and increased glutamate release induced by quinolinic acid, an *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor agonist in the hippocampus of a murine model of seizures [12, 27]. Furthermore, considering the need for advances in effective treatments for patients suffering from glioma, the study of statin effects has been considered as a potential approach to improve glioma treatment.

In this study, we evaluated ATOR effects in comparison with TMZ or both drugs combined on cell viability, type of cell death, migration, proliferation, and glutamatergic system parameters. We demonstrated ATOR effect of decreasing glioma cell viability via glutamatergic signaling, inhibiting migration and proliferation, and increasing apoptotic cell death and autophagy. TMZ showed effect of reducing cell viability in a high concentration and preventing migration, but it did not induce apoptosis. These findings indicate an improved effect of ATOR as a cytotoxic approach against glioma cells.

## Material and Methods

**Cell Culture** The glioma cell line A172 (a kind gift from Dr. G. Lenz from Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

RS, Brazil) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium and nutrient mixture F12 (DMEM-F12, Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab), in 25-cm<sup>2</sup> culture flasks, at 37 °C humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, as previously reported [28]. For the biochemical analysis, when reached confluence, A172 cells were trypsinized (trypsin/EDTA, 0.05%; Gibco) and plated in 6, 12, 24, or 96-well plates ( $1 \times 10^6$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$  cells, and  $1 \times 10^4$  cells, respectively).

Primary culture of astrocytes was prepared from cerebral cortex obtained from newborn (0–3 days old) Wistar rats, as previously described [29]. Briefly, astrocytes were dissociated from the tissue mechanically and plated onto 24-well culture plates ( $3.5 \times 10^5$  cells/well) previously coated with polylysine (0.1 mg/mL; Sigma) and grown to confluence (10–14 days) in the presence of DMEM-F12 supplemented with FBS at 10%. This procedure was approved by the university's Ethical Committee of Animal Research (CEUA/UFSC).

**Cell Treatment** After confluence, the astrocytes were treated with ATOR (0.1 to 20  $\mu$ M; Sigma) for 48 h. The A172 cells were treated with ATOR (5–20  $\mu$ M), TMZ (500  $\mu$ M; Tocris) for 24 or 48, or ATOR (10  $\mu$ M) + TMZ (500  $\mu$ M) for 48 h. In order to assess ATOR mechanism of action, the adenosine and glutamate receptor antagonists and glutamate transporter inhibitors were incubated 30 min before ATOR and maintained during 48-h treatment. Drugs used were as follows: adenosine A<sub>1</sub> receptor (A<sub>1</sub>R) antagonist dipropylcyclopentylxanthine (DPCPX 100 nM), adenosine A<sub>2A</sub> receptor (A<sub>2A</sub>R) antagonist 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (ZM241385 50 nM), the glutamate receptor subtypes  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) and kainate receptor (KAR) antagonist 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX 1  $\mu$ M), the glutamate subtype *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonist dizocilpine (MK-801 1  $\mu$ M), KAR antagonist  $\gamma$ -D-glutamylaminomethylsulphonic acid (GAMS 1  $\mu$ M), metabotropic glutamate receptor (mGluR) antagonist (*RS*)- $\alpha$ -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG 10  $\mu$ M), the broad spectrum inhibitor of excitatory amino acid transporters (EAATs) DL-*threo*- $\beta$ -benzyloxyaspartic acid (DL-TBOA 100  $\mu$ M), and the  $Xc^-$  system inhibitor sulfasalazin (SAS 300  $\mu$ M). The control groups (CTs) were incubated with DMEM-F12 only.

**Viability Analysis** Cell viability was evaluated through cells' capacity to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) as previously described [30]. In this assay, viable cells convert water-soluble yellow MTT to water-insoluble blue MTT formazan. Thus, MTT formazan production, identified by optical density, is assumed to be proportional to the number of viable cells.

Cells were incubated with MTT (0.2 mg/mL) in PBS for 2 h at 37 °C. The formazan produced was solubilized by replacing the medium with 100 µL of dimethylsulfoxide (DMSO), resulting in a colored compound from which optical density was measured in an ELISA reader (550 nm).

The CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability assay was also used to access the cell viability. ATP quantification was assayed as an indicator of metabolically active cells. According to the manufacturer's recommendations, the cells were maintained in room temperature for 30 min. Briefly, the CellTiter-Glo® reagents were added, and the plate incubated in orbital shaker for 2 min. The luminescent signal was stabilized for 10 min at room temperature, and the total luminescence recorded.

The trypan blue exclusion assay was also applied [31]. After time treatment, cells were stained with trypan blue and counted in hemocytometer. The percentage of viable cells was calculated: % viable cells = (number of viable cells / number of total cells) × 100.

**Migration Analysis** In order to analyze changes in cell migration, the wound healing assay was carried out according to previous studies [32, 33]. Briefly, cells were plated in 6-well plates; after 24 h, a Pippete-200 tip was used to scrap the dish surface to generate the “wound” and the medium was replaced for FBS-free medium containing drugs. Phase contrast images were obtained using a 10× objective lens in an inverted microscope at 0, 24, and 48 h. To each experiment, a scratch was carried out in five replicates, and the experiment was repeated three times. The gap width was calculated by 10 measurements from each scratch to obtain the width average. Each measurement was taken from the left edge to the right edge of the scratch, going from the top to the bottom of the image using ImageJ software. The average of the width was expressed in arbitrary units.

Intending to confirm changes in cell migration, the transwell migration assay was carried out according to a previous study [34]. The cells were detached from culture bottle then centrifuged and resuspended in a serum-free culture medium to reach  $5 \times 10^4$  cells/well. The cell solution was plated on top of ThinCert™, either with or without ATOR and/or TMZ treatments, and incubated for 10 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. A DMEM-F12 20% FBS solution was used on the bottom of the lower chamber in a 24-well plate as chemoattractant. After 48 h of incubation, the cells on the lower side of the chamber were stained with Hoescht (5 µg/mL) for 10 min and counted on a fluorescence microscope. The number of migrated cells was counted in 10 randomly selected fields from each membrane. Each group had three replicates, and the experiment was repeated three times independently.

**Cell Proliferation Analysis** In order to analyze A172 cell proliferation, after treatment, cells were fixed with paraformaldehyde 4% and the cells were incubated with Ki-67 antibody (Millipore) overnight (1:500 at 4 °C). Then, the cells were incubated with anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated with Alexa Fluor-488 at room temperature for 60 min (1:500; Abcam). The nucleus was stained with Hoechst (5 µg/mL; Sigma) for 10 min. Ten random fields were photographed *per* replicate in fluorescent microscope, and the cells were counted. The number of cells with Ki-67 positive stained was divided by total Hoechst cell stained to establish a cell proliferating rate. Each group had three replicates, and the experiment was repeated three times independently.

**Apoptosis and Necrosis Analysis** To analyze the effect of ATOR and TMZ on apoptosis or necrosis levels in glioma cells, the Annexin V-FITC assay kit (Millipore) was used in flow cytometry. The kit detects specific biochemical change in the cell surface membrane. Annexin V-FITC conjugated binds to phosphatidylserine exposed at cell surface in apoptotic cells. Propidium iodide binds to DNA in cells with compromised cell membrane indicating necrotic cells. After treatment, cells were trypsinized, centrifuged at 220×g, and washed in cold PBS, then resuspended in 200 µL of binding buffer. FITC-conjugated annexin V and propidium iodide reagent staining was performed in concentrations and time recommended by the manufacturer. The cells were sorted by FACSCanto II flow cytometer and results processed on Flowing Software 2.

**Autophagy Analysis** To identify the presence of acidic vesicular organelles (AVOs), cells were plated in 24-well dishes. After 24 h, the cells were treated. Elapsed 48 h of treatment, the cells were washed with PBS and incubated with Acridine orange (Sigma) 10 µg/mL for 10 min in room temperature. Then, the solution was replaced to PBS, and the cells were analyzed under an inverted fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 40 CFL, capture system AxioCamMRc). Depending on their acidity, the autophagic lysosomes appear as orange/red AVOs, while cytoplasm and nuclei are green. The analyses were carried out using a 490-nm bandpass blue excitation and a 515-nm long pass barrier filters. In order to quantify AVO presence, cells were counted through flow cytometry. After treatment, cells were PBS washed and incubated with Acridine orange 1 µg/mL for 15 min. Then, the cells were trypsinized, centrifuged at 220×g, and resuspended in 500 µL of PBS-EDTA 0.2 µM. The cells were sorted by FACSCanto II flow cytometer and results processed on Flowing Software 2.

**L-[<sup>3</sup>H]Glutamate Transport** To analyze this parameter, cells were concomitantly plated for transport assays and cell counting, for experiment normalization. After drug

incubation, culture medium was removed and the cells were incubated in Hanks-buffered saline solution (HBSS, composition in mM: 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 137 NaCl, 5 KCl, 0.65 MgSO<sub>4</sub>, 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 glucose, and 5 HEPES) (pH 7.2) for 15 min at 37 °C. Excitatory amino acid release was assessed through adding 0.33 μCi/mL of L-[<sup>3</sup>H]glutamate (American Radiolabeled Chemicals (ARC)), plus L-glutamate to reach final concentration of 100 μM and incubated for 7 min. The reaction was stopped with three ice-cold HBSS washes. Cells were incubated in HBSS for 15 min in 300 μL at 37 °C, and the medium was collected to measure L-[<sup>3</sup>H]glutamate release. The cells were lysed in the NaOH 0.1 N/SDS 0.1% solution overnight, and the L-[<sup>3</sup>H]glutamate content was used to assess the neurotransmitter uptake, determined through scintillation counting [35]. Cells that were concomitantly plated were counted in hemocytometer, and experiment was normalized as femtomole of glutamate per number of viable cells after treatment.

**Glutamine Synthetase Activity** The assay of the glutamine synthetase enzyme activity has been adapted from Shapiro [36] and Vandresen-Filho et al. [37]. For evaluating drug effects on glutamine synthetase activity in human glioma A172 cells, after treatment, the cells were harvested and washed in PBS. Then, the cells were incubated for 15 min in 200 μL of imidazole-HCl buffer (80 mM, pH 7.0) and homogenized. The assay mixture contained 80 mM imidazole-HCl buffer, 30 mM glutamine, 3 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM hydroxylamine-HCl, 20 mM sodium arsenate, 0.4 mM ADP, and 50 μL of the cell homogenate. The reaction was stopped after 30 min at 37 °C through addition of 100 μL of a mixture containing 4/1/0.5/6.5 (v/v/v/v) of 10% (w/v) ferric chloride, 24% (w/v) trichloroacetic acid, 6 M HCl, and water. The reaction product, γ-glutamylhydroxamate, was measured at 540 nm using a microplate reader and converted to the amount of product formed through comparison with a standard curve. The enzyme activity was expressed as percentage of control.

**Protein Measurement** Protein content was evaluated by using the method of Lowry [38], and bovine serum albumin (Sigma) was used as standard.

**Statistical Analysis** Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), when treated groups were compared only to the control group, or two-way ANOVA when the comparisons assessed different times and concentration groups. The ANOVA analyses were followed by Student-Newman-Keuls test. The software used was GraphPad Prism 4.0 for one-way analysis or Statistica 7.0 for two-way analysis, considering significance level  $p < 0.05$ .

## Results

### Viability Assays

A time course and concentration curve of ATOR was carried out in order to study the statin effect on A172 cell viability (Fig. 1a). ATOR at 5, 10, or 20 μM was evaluated in 24, 48, and 72 h of incubation time. In 24 h of incubation, none of the ATOR concentrations changed glioma cell viability. However, after 48 h of ATOR treatment, A172 cells showed a viability reduction at 10 μM concentration, compared to the control group. This effect was not observed with 5 or 20 μM ATOR treatments (Fig. 1b). After 72 h of treatment, significant cell viability reduction related to the control group was still observed with 10 and 20 μM ATOR treatment, but not with 5 μM. Thus, the concentration of 10 μM ATOR at 48 h of treatment was chosen because it presents greater efficacy in reducing cell viability at an intermediate time course of treatment (Fig. 1b).

To exclude a putative cytotoxic effect of ATOR in healthy cells, a concentration curve assay was conducted in primary cortical astrocyte cultures (Fig. 1c). ATOR concentrations from 0.1 to 20 μM for 48 h were tested, and none of these concentrations modified astrocytic viability, demonstrating the safety of ATOR treatment.

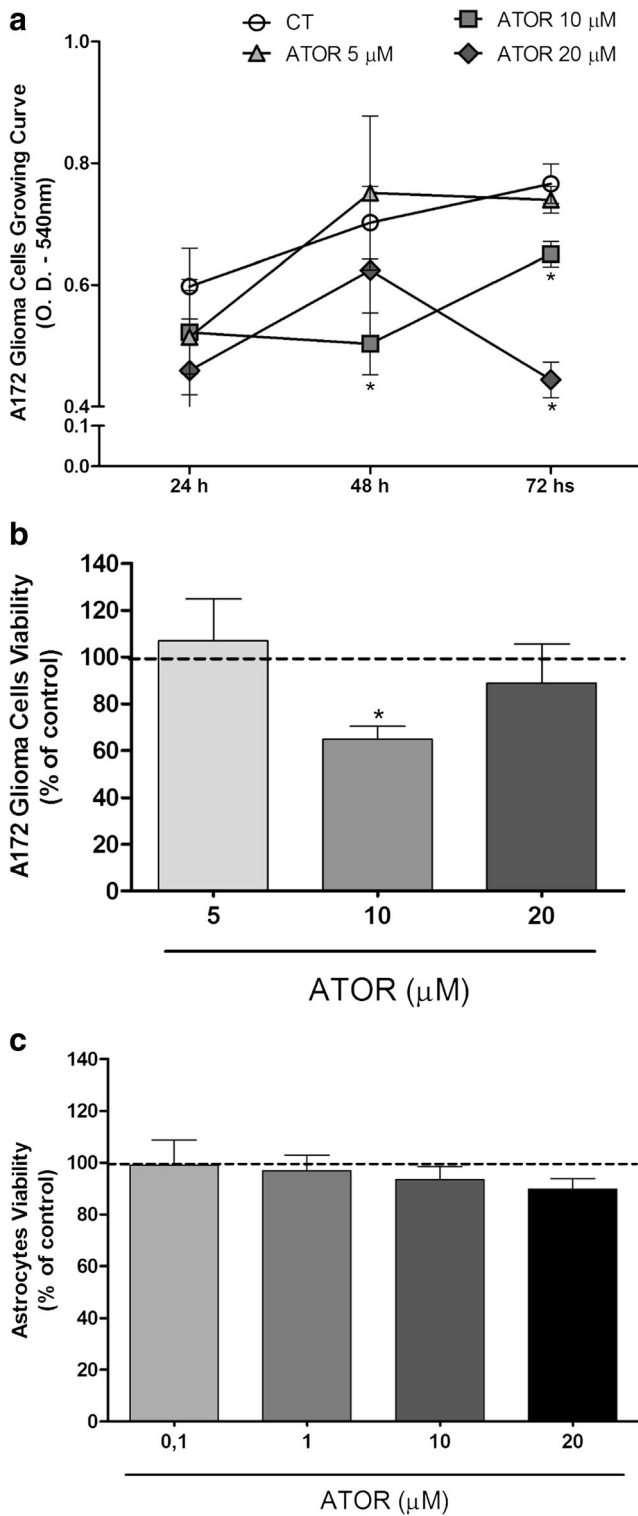
As TMZ is a drug largely used in cancer treatment, we also tested its effect and its association with ATOR on glioma cell viability. Two hundred micromolar TMZ was initially tested to study the effectiveness in a concentration 20 times higher than the ATOR on A172 cell viability; however, it did not change the glioma cell viability (data not shown). The A172 cells were then treated for 48 h with ATOR (10 μM), TMZ (500 μM), or both drugs co-incubated and tested in three different viability methods. By evaluating the reductive capacity of cells, through the MTT reduction assay, it was observed a decrease of 40, 50, and 55% in glioma cell viability as compared to control cells, in the presence of ATOR, TMZ, or ATOR + TMZ, respectively. No significant differences were observed among these three groups of treatment (Fig. 2a).

Cell viability was also assessed through CellTiter-Glo® reagent. ATOR, TMZ, or drug co-incubation treatment showed a decrease in cell viability of 63, 55, and 75%, respectively, with no statistical difference between groups (Fig. 2b). The trypan blue exclusion assay, a cell counting-based method, was also applied. Similarly, cell counting assay showed a decrease in cell viability. The values were 66, 63, or 68%, for ATOR, TMZ, or ATOR + TMZ, respectively, with no statistical differences between groups of treatment (Fig. 2c).

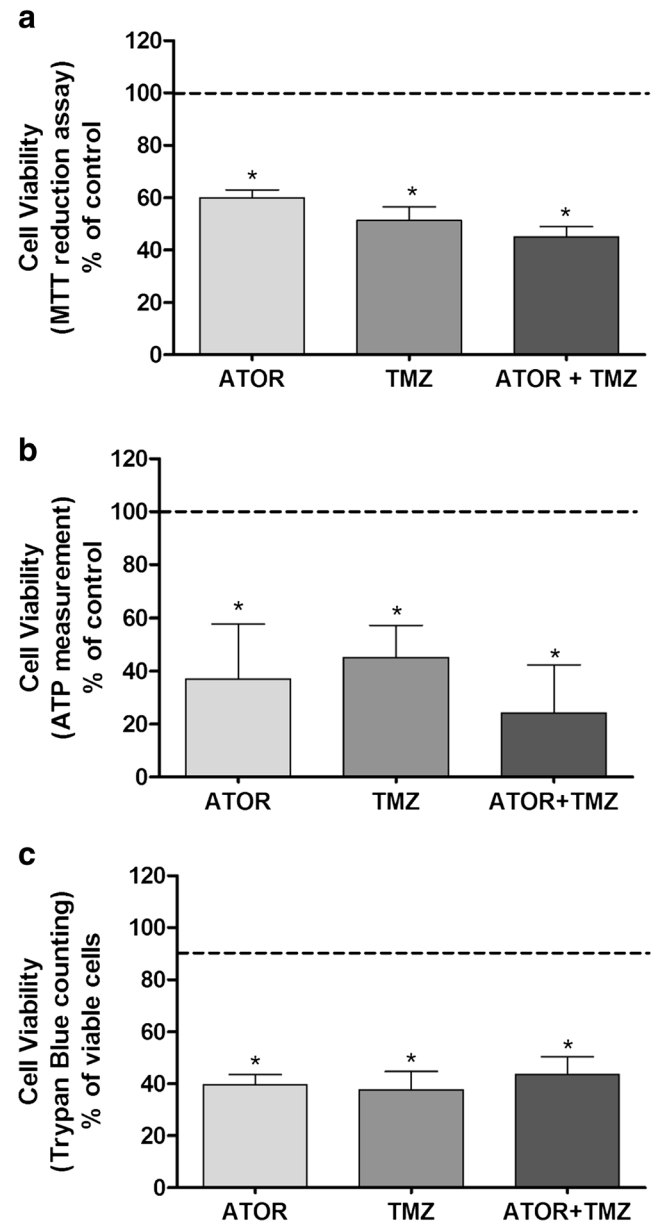
### Migration Analysis

Aiming to evaluate ATOR effect on glioma cell migration capacity, a scratch assay was performed (Fig. 3a, b). Cells were treated with ATOR (10 μM), TMZ (500 μM), or



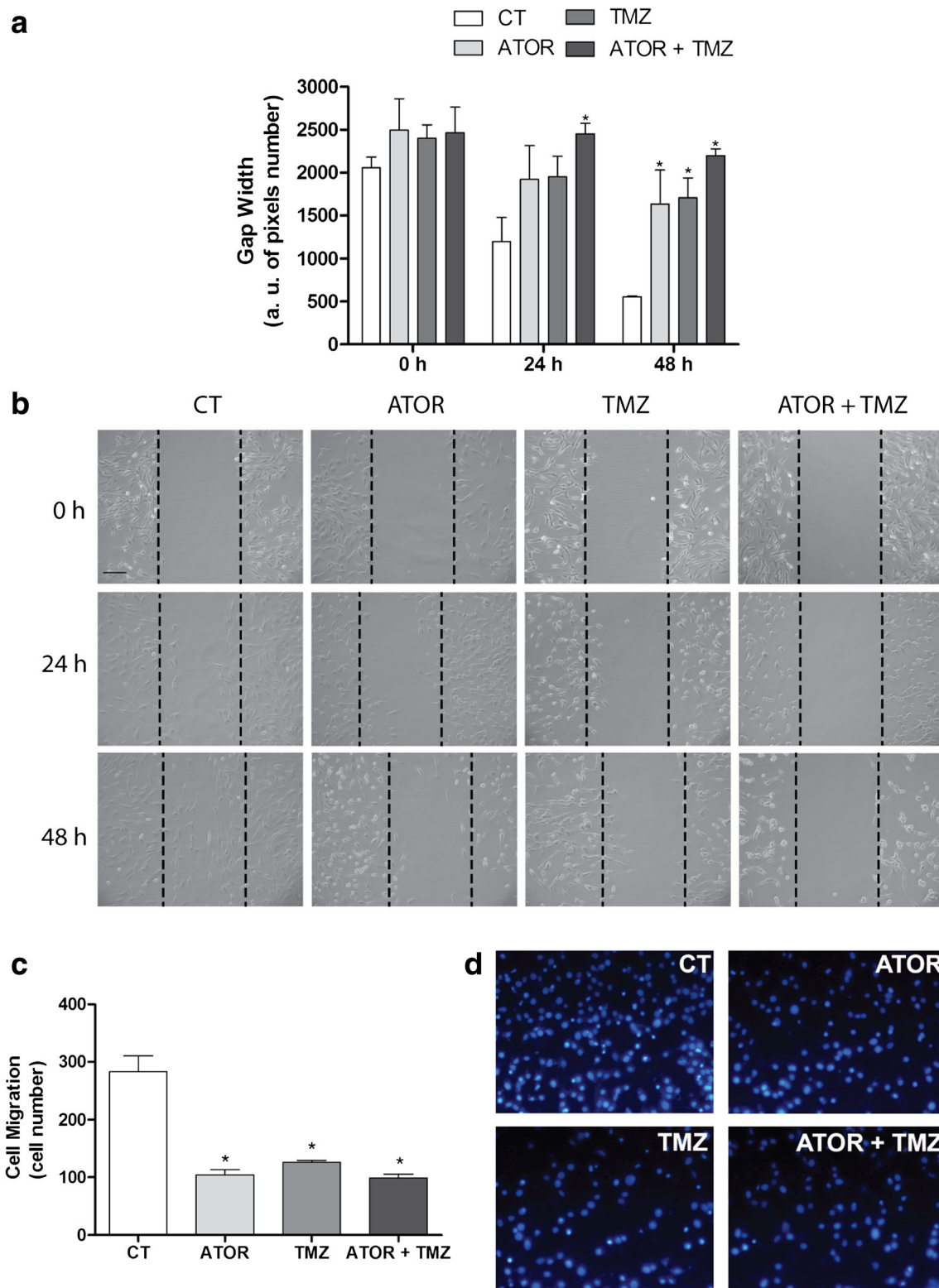


**Fig. 1** ATOR time course and concentration-response curves on A172 glioma cells and astrocyte viability. **a** ATOR time course/concentration curve was performed in A172 glioma cells to assess cellular viability. **b** A172 cells were treated with ATOR (5, 10, or 20 μM) for 48 h, and the viability was assessed. **c** Cortical astrocytes were treated with ATOR (0.1–20 μM) for 48 h, and viability was assessed. Data expressed as optical density (OD) at 540 nm in **a** and as percentage related to the control group (dotted line) in **b** and **c**.  $n = 6$  of independent experiments for **a**, **b**, and **c** separately. \* $p < 0.05$  compared to the control group



**Fig. 2** ATOR and TMZ effects on glioma cell viability. **a** A172 glioma cell viability assessed by MTT reduction assay after 48 h of ATOR (10 μM), TMZ (500 μM), or drug combination treatment. **b** A172 cell viability assessed by an ATP-based assay in cells treated with ATOR (10 μM), TMZ (500 μM), or both treatments for 48 h. **c** Cell viability assessed through direct cell counting using trypan exclusion assay. A172 glioma cells were treated with ATOR (10 μM), TMZ (500 μM), or both for 48 h. Values expressed as viable cells, being control group around 90% of viable cells. Data expressed as a percentage related to the control group that was considered as 100% (**a**, **b**, **c**) and expressed as dotted line.  $n = 5$  of independent experiments for **a**;  $n = 3$  of independent experiments for **b** and **c**. \* $p < 0.05$  compared to the control group in **a**, **b**, and **c**

co-incubated with both drugs. Images were obtained shortly after the treatment, after 24 and 48 h. Evaluation after 24 and 48 h showed that the glioma cells filled the wound as expected, wherein in the last time point, the cells occupied around 70% of the gap. After 24 h of treatment with ATOR or TMZ,



**Fig. 3** ATOR and TMZ effects on cell migration. **a** After confluence, cells were treated (ATOR 10  $\mu$ M; TMZ 500  $\mu$ M; ATOR 10  $\mu$ M + TMZ 500  $\mu$ M), the scratch assay was performed, and the cells photographed subsequently and after 24 and 48 h. Gap width was quantified as arbitrary units of pixels number on ImageJ software. **b** Illustrative images from cells subjected to the scratched protocol and evaluated after 0, 24, and 48 h, scale bar 200  $\mu$ m. **c** The cells were plated and treated on ThinCert<sup>TM</sup>

chamber at same treatment protocol used in wound healing, and 48 h after, cells were photographed. Ten random fields were counted in each replicate; each drug treatment had three replicates. **d** Illustrative images from cells subjected to the transwell protocol and evaluated after 48 h of treatment.  $n = 3$  of independent experiments for each technique. \* $p < 0.05$  compared to the same time control group

glioma cells did not change their migratory capacity, filling the wound similarly as observed in control cells. However, ATOR plus TMZ showed a potentiation effect, inhibiting cell migration capacity as compared to 24-h control group. Glioma cells treated with ATOR for 48 h also showed an inhibition of migratory capacity similar to TMZ group, and the co-treatment did not increase the effect of inhibiting glioma cell migration.

To study with more accuracy ATOR effect on cell migration, a Transwell ThinCert™ migration assay was applied. The CT group showed an average of 282 migrating cells, while ATOR, TMZ, and ATOR plus TMZ showed 104, 126, and 99 migrating cells (Fig. 3c). Thus, ATOR, TMZ, and drug combination reduced 63, 56, and 65% of migrating cells, respectively. No statistical difference was observed among the treatments.

### Cell Proliferation Analysis

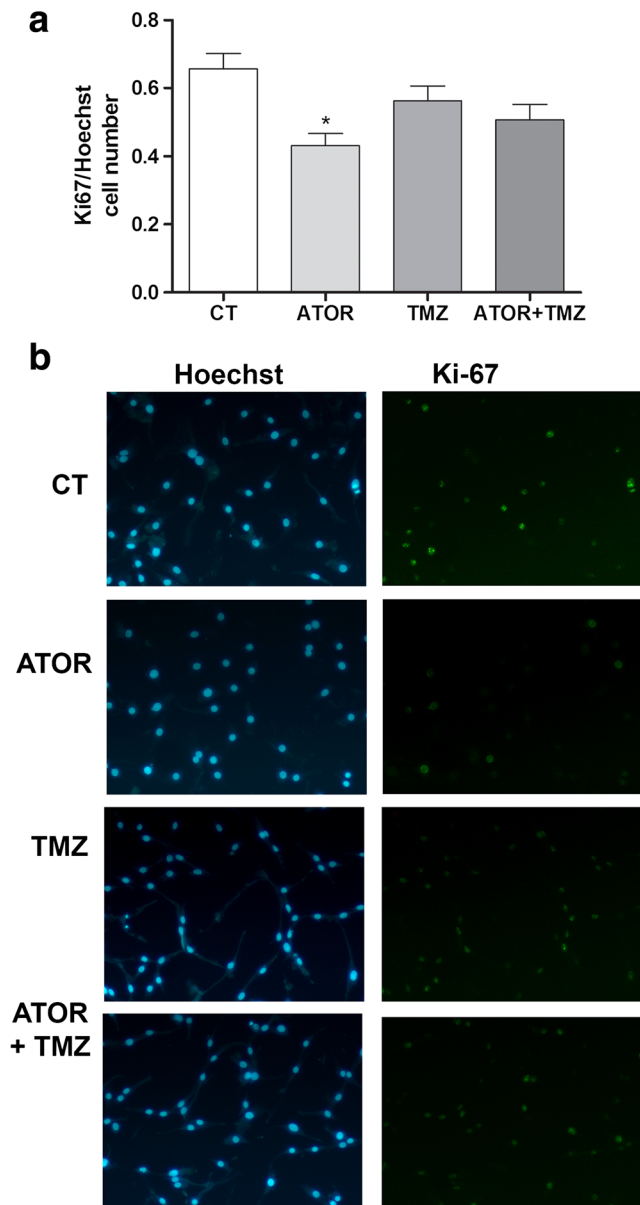
After identifying the cytotoxic effect of ATOR and its ability to reduce cell migration, it was necessary to study ATOR effect on cell proliferation. For this purpose, cells were immunostained with Ki-67 and counted. Hoechst was used to stain total cell number. The Ki-67-positive cell number was divided by the total cell number. ATOR treatment promoted a decrease of 33% in the proliferating cell number (Fig. 4). TMZ and the drug combination showed a 15 and 23% of reduction and did not reach statistical significance. Figure 4b shows representative images from Ki-67-positive cells staining in treated and untreated cells.

### Apoptosis and Necrosis Analysis

The apoptosis-necrosis analysis was carried out through an Annexin V-FITC/propidium iodide assay in A172 cells treated with ATOR (10  $\mu$ M), TMZ (500  $\mu$ M), or the drug combination, after 48 h of treatment (Fig. 5a, b). ATOR raised nearly threefold the apoptosis levels in comparison to control cells. TMZ did not show significant increase in this cell death type. ATOR and TMZ combination demonstrated a fivefold increase in apoptosis levels, significantly higher than ATOR, TMZ, and control groups. In regard to necrotic cell death, no alterations were observed with ATOR or TMZ treatments (Fig. 5a). Figure 5b shows representative dot plots from A172 cells treated with ATOR (10  $\mu$ M), TMZ (500  $\mu$ M), or the drug combination, after 48 h of treatment.

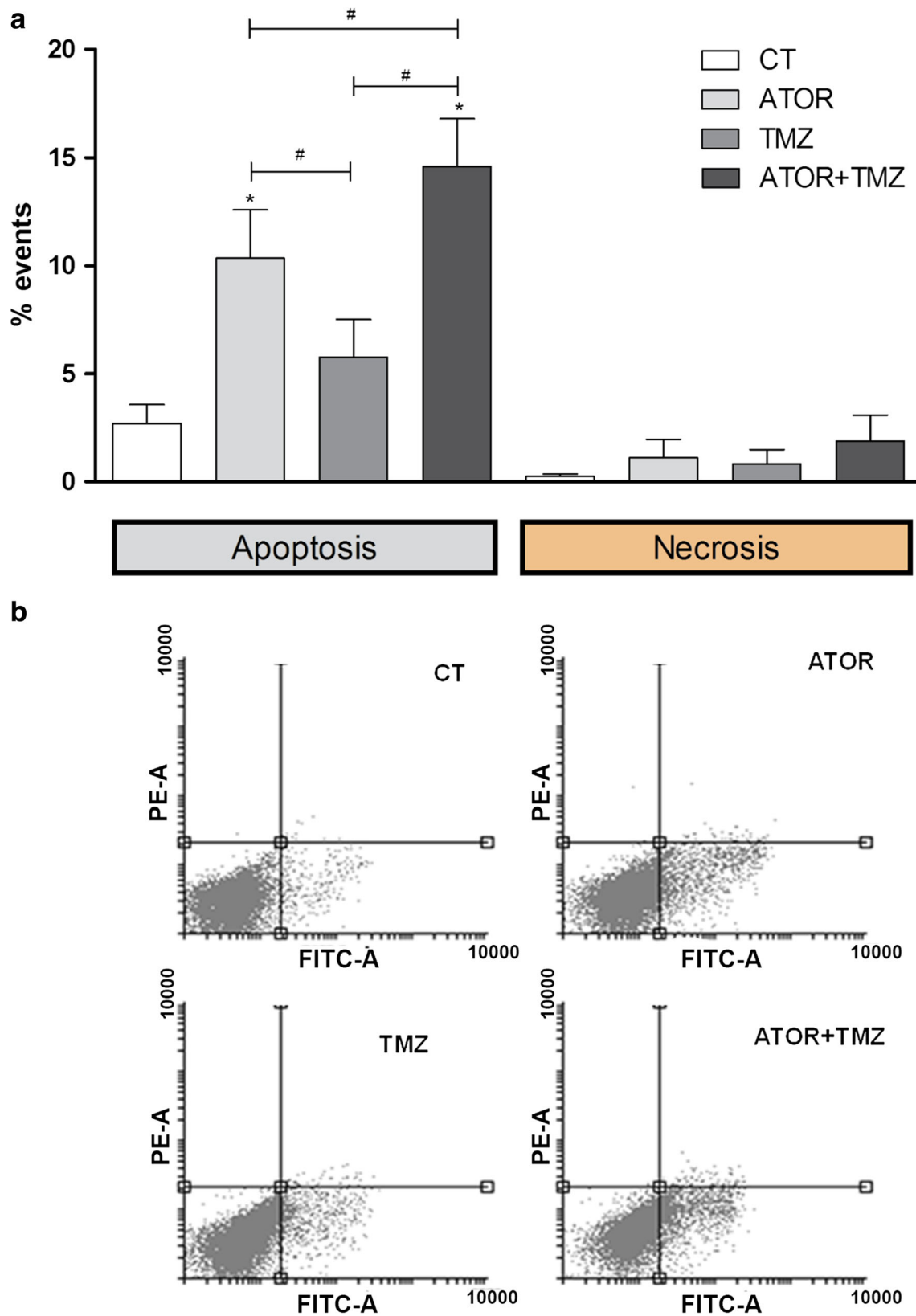
### Autophagy Analysis

Acridine orange is a cell-permeable cationic fluorescent dye which indicates the AVO staining, that suggests the occurrence of autophagy. The glioma cells were treated with ATOR (10  $\mu$ M), TMZ (500  $\mu$ M), and this drug combination, and after



**Fig. 4** ATOR effect on cell proliferation. **a** After confluence, A172 cells were treated (ATOR 10  $\mu$ M; TMZ 500  $\mu$ M; ATOR 10  $\mu$ M + TMZ 500  $\mu$ M). Forty hour treatment time elapsed, the cells were stained with paraformaldehyde fixed and stained with Ki-67 antibody. The quantification was assessed by counting Ki-67-positive and total cells (Hoechst stained). Ten random fields were counted in each replicate; each drug treatment had three replicates. **b** Illustrative images from Ki-67-positive cells and total cells evaluated after 48 h of treatment. Ki-67-positive cells (*green*), Hoechst nucleus staining (*blue*).  $n = 3$  of independent experiments. \* $p < 0.05$  compared to the same time control group

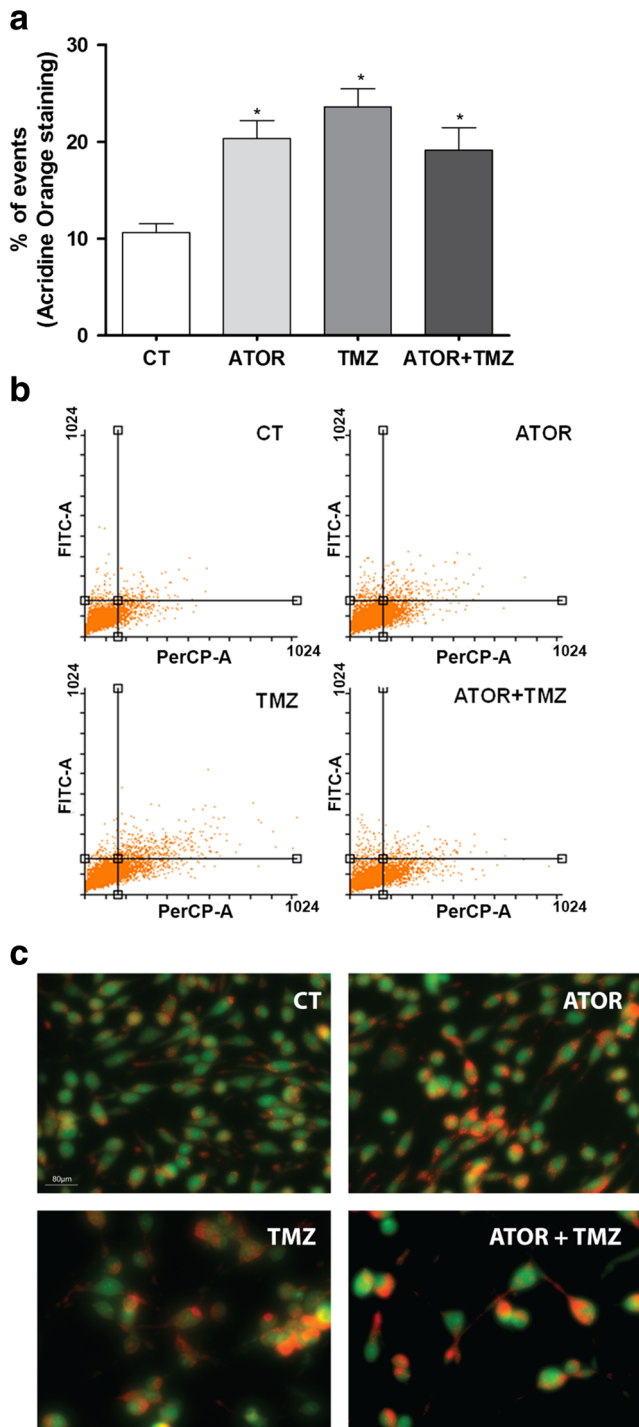
48 h of treatment, a quantification through flow cytometry was performed. ATOR treatment promoted a twofold increase in the amount of AVOs. TMZ or the drug combination also raised AVO staining, similarly to ATOR (Fig. 6a). Figure 6b shows representatives dot plots obtained through flow cytometry. Representative photomicrographs show AVO presence and



**Fig. 5** ATOR and/or TMZ effects on apoptosis levels in A172 cells. **a** After confluence, A172 cells were treated with ATOR 10  $\mu$ M, TMZ 500  $\mu$ M, or with the drug combination. After 48 h, cells were detached, washed, and stained with annexin V and/or propidium iodide and counted

in a flow cytometer. **b** Illustrative dot plots.  $n = 5$  of independent experiments. \* $p < 0.05$  compared to the control group, # $p < 0.05$  compared to ATOR group, and # $p < 0.05$  compared to TMZ group

changes in cell number following ATOR or TMZ treatment (Fig. 6c). These observations could reinforce the cytotoxic potential of these compounds on glioma cells.



**Fig. 6** ATOR and TMZ effects on autophagy in A172 glioma cells. **a** After confluence, A172 cells were treated (ATOR 10  $\mu$ M; TMZ 500  $\mu$ M; ATOR 10  $\mu$ M + TMZ 500  $\mu$ M). After 48 h of treatment, the cells were washed and stained with Acridine orange and counted in a flow cytometer. **b** AVO presence quantification. **c** Representative images of Acridine orange cell staining, scale bar 80  $\mu$ m.  $n = 5$  independent experiments.  $*p < 0.05$  compared to the control group

### Atorvastatin Effect on Glutamate Transmission

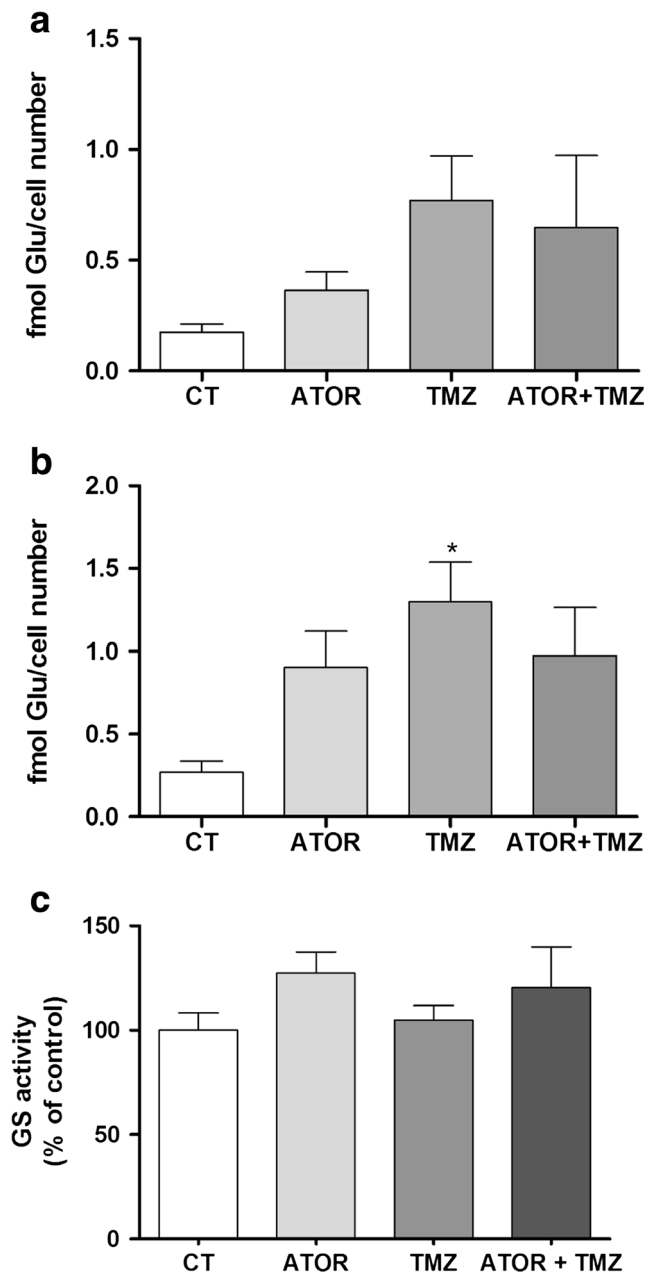
As glutamatergic transmission changes were observed in several glioma cells, parameters of glutamate transport and metabolism were analyzed. It was studied the ATOR effect in glutamate transport in A172 cells treated with ATOR (10  $\mu$ M), TMZ (500  $\mu$ M), or the drug combination, after 48 h of incubation. ATOR, TMZ, or ATOR + TMZ did not significantly alter glutamate uptake (Fig. 7a). Regarding glutamate release from A172 glioma cells, it was observed that TMZ increased glutamate release, whereas ATOR or ATOR + TMZ showed a tendency of increasing glutamate release, although no statistical significance was reached (Fig. 7b).

Glutamine synthetase (GS) is the enzyme responsible for converting the glutamate taken up from the extracellular space to glutamine into astrocytes; thus, GS is involved in regulating extracellular glutamate levels [39]. The activity of GS in A172 cells treated with ATOR and the chemotherapeutic compound for 48 h was assessed. No alterations were observed on GS activity in A172 cells treated with ATOR, TMZ, or ATOR + TMZ (Fig. 7c).

A putative glutamatergic system involvement in ATOR effect was also studied through pharmacological blockade of glutamate transporters and evaluation of cellular viability. Considering the slight effect of ATOR on glutamate release from glioma cells, glutamate transporter blockers were used and incubated for 30 min before ATOR treatment. DL-TBOA (100  $\mu$ M), a non-transportable broad-spectrum glutamate transporter inhibitor, and SAS (300  $\mu$ M), a  $Xc^-$  system inhibitor, were tested. None of EAAT inhibitors altered ATOR effect, suggesting that ATOR did not decrease A172 cell viability through glutamate transporter modulation (Fig. 8a).

As the nucleoside adenosine regulates glutamatergic transmission and transport, adenosine receptor involvement on ATOR effect over A172 cells was also evaluated. DPCPX (100 nM), an  $A_1R$  antagonist, and ZM241385 (50 nM), an  $A_{2A}R$  antagonist, were used. No antagonist altered ATOR effect of decreasing cell viability, discarding the participation of adenosine receptors on ATOR effect (Fig. 8b).

Ionotropic glutamate receptor (iGluR) involvement was also evaluated. MK801 (1  $\mu$ M), a NMDAR antagonist, alone did not change glioma cell viability. However, preincubation of MK801 partially prevented the reduction in cell viability observed with ATOR alone (Fig. 8c). DNQX (1  $\mu$ M), a non-selective AMPA, and kainate (KA) receptor antagonist also did not change glioma viability alone, while it partially prevented ATOR effect (Fig. 8c). A selective KA receptor antagonist, GAMS (1  $\mu$ M), was also tested. GAMS per se had no effect on glioma viability, though GAMS partially prevented viability decrease caused by ATOR (Fig. 8d). Additionally, the metabotropic glutamate receptor (mGluR) contribution on



**Fig. 7** Effects of treatment with ATOR and/or TMZ on glutamate transport and glutamine synthetase (GS) activity. **a** After confluence, A172 glioma cells were treated with ATOR 10  $\mu$ M, TMZ 500  $\mu$ M, or both during 48 h and then was evaluated the levels of glutamate uptake into A172 cells. **b** Glutamate release from A172 cells. The glutamate content was normalized to viable cell number. **c** After ATOR and/or TMZ treatment (48 h), the A172 cells were detached from the culture bottles and washed, and the GS activity was measured.  $n = 5$  of independent experiments for **a**, **b**, and **c** separately. \* $p < 0.05$  compared to the control group

ATOR cytotoxicity was also tested. A non-selective metabotropic glutamate receptor antagonist, MCPG (10  $\mu$ M), was used. As observed with iGluR antagonists, MCPG showed no effect per se and partly precludes ATOR cytotoxic effect (Fig. 8d).

## Discussion

Malignant gliomas are tumors with high invasiveness and growth capacity [40]. Despite all the knowledge on this type of cancer and several available therapies, patient prognosis remains poor and the chemotherapy adverse effects are aggressive (Fig. 9). In this way, studies concerning drugs with few side effects that improve the cytotoxicity over gliomas are highly desirable [41, 42].

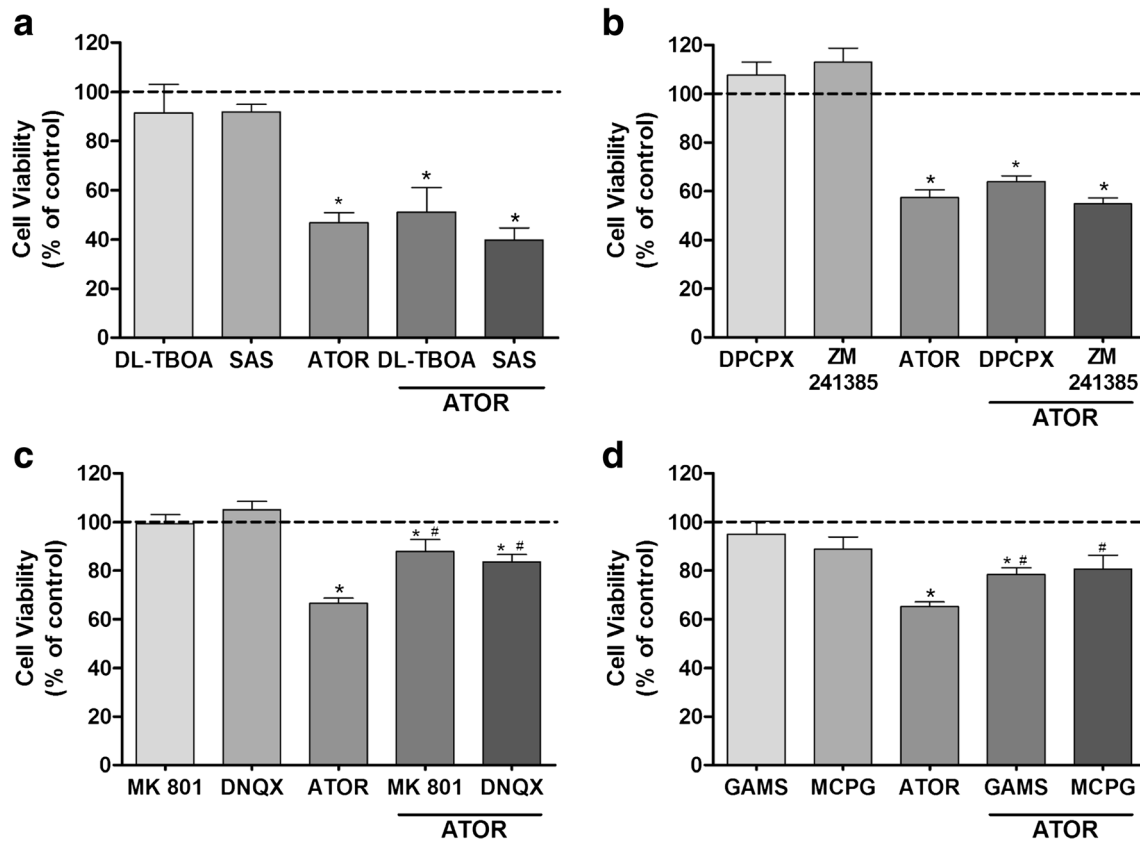
Statin treatment decreasing glioma cell viability had been already described. Mevastatin, fluvastatin, simvastatin, atorvastatin, and lovastatin showed toxicity to several glioma cell lines, such as C6, U251MG, U87, and U118 [22, 43–45]. Moreover, statin combination with other drug categories in brain cancer treatment has also been studied, such as antiinflammatory, thiazolidinedione, and topoisomerase inhibitors reducing glioma cell survival [22, 45, 46]. In the present study, ATOR and TMZ combination showed similar effect as ATOR alone on glioma cell viability, cell migration, and cell death via apoptosis and autophagy.

Concerning glioma migration and invasion, it was shown that lovastatin treatment suppressed these events in U343 and U87 glioma cell lines [47]. Also, it was suggested that simvastatin inhibited U251 and U87 migration through reducing mevalonate levels [19]. Moreover, ATOR reduced U87 cell migration capacity and efficiently decreased the microglia supporting effect on glioma migration [23]. We here confirm and extend data that ATOR suppresses glioma cell migration, as well as TMZ and the drug combination.

ATOR also was able to decrease cell proliferation in A172 glioma cells, while TMZ and drug combination did not change this mechanism. Decrease in proliferation could prejudice cell migration results. However, a more specific assay for migration (Transwell ThinCert<sup>TM</sup>) showed a high reduction in cell migration then observed on cell proliferation. It was already described that migration and proliferation are not necessarily related in several cancer cells [48].

ATOR lactonization allows its transformation to a lactone, which can cross the BBB [20, 21]. In general, ATOR side effects are well tolerated [7], and a large amount of clinical data has demonstrated the safety of high doses of this statin [49, 50]. However, studies in vitro have shown that ATOR concentrations higher than 20  $\mu$ M may be damaging to neurons [26]. Other statins have also shown potentially harmful effects to motoneurons at concentrations higher than 20  $\mu$ M [51]. The low concentration used in this study shows no toxic effect to normal cortical astrocytes, and it is effective in reducing A172 glioma cell viability.

It was already described that statins have the potential to induce apoptosis in C6 glioma cells, via the suppression of ERK1/2 activation [44]. Lovastatin and ATOR combination increases caspase-3 activity in human glioma cell line, indicating an increment in apoptosis activation [22]. Simvastatin



**Fig. 8** Evaluation of glutamatergic and purinergic systems on cytotoxic effects of ATOR on A172 glioma cells. After confluence, A172 glioma cells were pretreated with transporter inhibitors or receptor antagonists then incubated with ATOR for 48 h, and cell viability was assayed via MTT reduction method. **a** DL-TBOA (100  $\mu$ M) or SAS (300  $\mu$ M) were used to analyze glutamate transporters or  $Xc^-$  system involvement on ATOR cytotoxic effect. **b** DPCPX (100 nM) or ZM241385 (50 nM) was used to evaluate adenosine receptor ( $A_1R$  and  $A_2AR$ ) participation on ATOR cytotoxic effect. **c** MK801 (1  $\mu$ M) or DNQX (1  $\mu$ M) was used

to analyze NMDA or AMPA receptor participation on ATOR cytotoxic effect. **d** GAMS (1  $\mu$ M) or MCPG (10  $\mu$ M) was used to analyze kainate or metabotropic glutamate receptor interaction on ATOR cytotoxic effect. Data expressed as a percentage related to the control group that was considered as 100% and expressed as dotted line.  $n = 6$  of independent experiments for **a**, **b**, **c**, and **d** separately. \* $p < 0.05$  compared to the control group; # $p < 0.05$  compared to ATOR group; \$ $p < 0.05$  compared to antagonist/inhibitor alone group

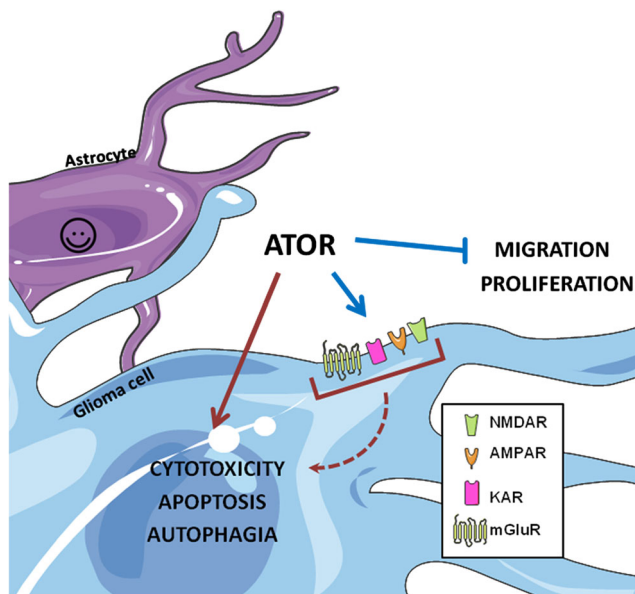
is also able to trigger apoptosis increase in human glioma cells through PI3K/Akt/caspase-3 pathway activation [19]. In a glioma xenograft model, simvastatin increases apoptosis [52]. Our results showed that ATOR slightly raised the apoptosis levels in glioma cells and no effect was observed in necrosis levels.

Our data did not show the apoptosis or necrosis occurrence in glioma cells treated with TMZ and it is probably associated with high chemoresistance of gliomas to chemotherapeutic compounds. However, a potentiation effect of ATOR plus TMZ was observed, and it might suggest that ATOR treatment sensitizes glioma cells to the chemotherapeutic compound effect, increasing the rate of cells undergoing apoptosis. Accurate additional studies about drug-drug interaction are necessary to confirm this hypothesis.

Recent studies have also demonstrated statin effects raising autophagy in several cancer types. ATOR activates autophagic processes in different digestive malignancy forms [53]. Simvastatin induces glioma cell death and causes autophagic

death associated with mTOR modulation [54]. Autophagic cell death is not the main cell death observed as a chemotherapy effect, but it was reported in glioma cells treated with TMZ, through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway [55, 56]. AVO presence is regularly seen as indicative of autophagic death due to the fact that autophagosomes and autophagolysosomes are acidic organelles. We also observed TMZ effects of increasing AVOs in flow cytometry. ATOR raised AVO levels as observed on TMZ. This can suggest that ATOR may be a drug capable to impair glioma cell viability with a low concentration as well as a high concentration of the tested chemotherapeutic compound, by activating programmed cell death pathways.

A relevant relationship between alterations in glutamatergic transmission and glioma development has been pointed out. It has been shown that glutamate uptake may be significantly reduced in gliomas, through a decrease in  $Na^+$ -dependent transporter expression and activity when compared to astrocytes [57]. Low glutamate uptake via EAATs



**Fig. 9** Schematic overview of ATOR effects. ATOR shows cytotoxic effect to glioma cells, but not to astrocytes. ATOR also induces increase on apoptosis and autophagy in addition to decrease A172 cell migration and proliferation. The cytotoxic effect of ATOR is partially abolished by ionotropic (NMDAR, AMPAR, and KAR) and metabotropic glutamate receptor (mGluR) blockade. This figure was produced using Servier Medical Art (<http://www.servier.com>)

provides a raise in tumor malignancy, by facilitating the proliferation and invasion; once released, glutamate induces an excitotoxic environment to the surrounding brain cells, enabling tumor survival [25, 58]. Additionally, glutamatergic signaling is essential to glioma development; thus, we tested the ability of ATOR to modulate glutamatergic parameters related to glutamate turnover, as glutamate uptake, glutamate release, and its metabolization to glutamine after being taken up into astrocytic-like cells. Our group has previously reported neuroprotective effects of ATOR via modulation of glutamate transport [12] and GS activity recovery [37]. In A172 glioma cells, ATOR did not interfere with glutamate transport or GS activity; thus, we focused on additional targets to understand its mechanisms of action.

Regarding glutamate receptor activation, it has been shown that it stimulates proliferation and migration in tumors [59]. Accordingly, the blockade of iGluRs as AMPAR, NMDAR, or KAR inhibits the proliferation and migration in human glioma cells [60]. It has been shown that the  $Ca^{2+}$ -permeable AMPAR activation promotes calcium influx, Akt phosphorylation by PDK1, and consequently glioma cell growth [61] and migration [62].

Studies reporting statin effects on cancer cells have evaluated intracellular mechanism, but the membrane protein targets to statin effects remain to be unraveled. Statins can modulate glutamatergic transmission in several pathological conditions. NMDAR excitotoxicity was prevented by statin treatment in cultured neurons [63]. ATOR also protected against

brain ischemia damage through a mechanism dependent on GluN2B NMDAR subunit activation [64]. Moreover, it was also previously shown that ATOR effects may depend on adenosine receptor activation [65]. Therefore, the cytotoxic effect of ATOR was herein evaluated after the pharmacological blockade of adenosine receptors and glutamate receptors and transporters.

Confirming the functional data on glutamate transport, pharmacological blockade of EAATs (with DL-TBOA or SAS) did not alter ATOR effect on glioma cell viability. ATOR cytotoxicity also seems not to be related to adenosine receptor activation, as  $A_1R$  and  $A_{2A}R$  antagonists showed no changes on ATOR cytotoxicity. However, ATOR effects may involve glutamate receptor interaction, as the antagonism of AMPAR, NMDAR, KAR, or mGluRs partially avoided ATOR effect, preventing the cell viability reduction.

The expression and activation of iGluRs have been suggested to be correlated with cancer aggressiveness. NMDARs are expressed in several cancer types, including A172 glioma cells, showing diverse subunit combinations accordingly to cancer origin [66–70]. NMDAR antagonism in cancer may decrease ERK1/2 phosphorylation, cAMP responsive element binding activation, and regulation of genes involved in cell cycle, also reducing cell viability and proliferation [67, 71]. It has been shown that some glioma cell lines such as U87-MG and U343 show no expression of NMDAR obligatory subunit GluN1 [66]. However, the NMDAR subunit expression may be variable in cancer cells. Here, we showed NMDAR involvement on ATOR effect, through pharmacological blockade of these receptors with MK801. This may suggest the presence of active NMDAR in A172 cells. AMPAR activation also regulates lung and pancreatic cancer growth, via MAP kinase signaling modulation [72, 73]. In this work, the blockade of AMPAR, KAR, and mGluR was also effective in partially preventing ATOR effect. AMPA GluA1 subunit was also previously demonstrated to be expressed in A172 glioma cells [74]. In this way, it is feasible that glutamate receptors may be a target to cytotoxic ATOR effect in glioma cells. Alternatively, ATOR may also affect intracellular signaling downstream similarly to GluR blockade by selective ligands, although it was previously shown that statins may bind to NMDAR [75].

In conclusion, for the first time, the effects of ATOR of decreasing A172 glioma cell viability, migration, and proliferation, raising apoptosis and autophagy, were described. ATOR cytotoxic effect may involve glutamate receptor-evoked signaling, but not glutamate transport. Considering these findings, further investigations regarding the protein targets and intracellular signaling pathways involved in cytotoxic effects of ATOR should be performed in order to better comprehend the ATOR mechanism in glioma and hereafter enable considering this drug as adjuvant in cancer therapy.



**Acknowledgements** This study was supported by grants from the Brazilian funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal/2012; INCT), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) (NENASC/PRONEX), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (PVE-052/2012) to C.I.T. and CNPq (Universal/2013) to C.B.N. T.D.-C. was recipient of a CAPES/PVE post-doctoral fellowship, and C.I.T. is recipient of CNPq productivity fellowship.

**Compliance with Ethical Standards** All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Liu C, Sage JC, Miller MR, Verhaak RG, Hippenmeyer S, Vogel H, Foreman O, Bronson RT et al (2011) Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell* 146(2):209–221. doi:10.1016/j.cell.2011.06.014
- Ohgaki H, Kleihues P (2009) Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 100(12):2235–2241. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x
- Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD (2006) Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J Clin Oncol* 24(8):1253–1265. doi:10.1200/JCO.2005.04.5302
- Rainov NG, Söling A, Heidecke V (2006) Novel therapies for malignant gliomas: a local affair? *Neurosurg Focus* 20(4):E9
- Desjardins A, Rich JN, Quinn JA, Vredenburgh J, Gururangan S, Sathornsumetee S, Reardon DA, Friedman AH et al (2005) Chemotherapy and novel therapeutic approaches in malignant glioma. *Front Biosci* 10:2645–2668
- Pannu R, Christie DK, Barbosa E, Singh I, Singh AK (2007) Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. *J Neurochem* 101(1):182–200. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04354.x
- Schachter M (2005) Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol* 19(1):117–125. doi:10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x
- Stein EA (2002) Management of dyslipidemia in the high-risk patient. *Am Heart J* 144(6 Suppl):S43–S50. doi:10.1067/mhj.2002.130302
- Yoshida M (2003) Potential role of statins in inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 10(3):140–144
- Rader DJ (2003) Therapy to reduce risk of coronary heart disease. *Clin Cardiol* 26(1):2–8
- Miida T, Takahashi A, Ikeuchi T (2007) Prevention of stroke and dementia by statin therapy: experimental and clinical evidence of their pleiotropic effects. *Pharmacol Ther* 113(2):378–393. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.09.003
- Piemartiri TC, Vandresen-Filho S, de Araújo HB, Martins WC, Dal'agnolo D, Stroeh E, Carqueja CL, Boeck CR et al (2009) Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res* 16(2):106–115. doi:10.1007/s12640-009-9057-6
- Piemartiri TC, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, de Bem AF, Prediger RD et al (2010) Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- $\beta$ (1-40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp Neurol* 226(2):274–284. doi:10.1016/j.expneurol.2010.08.030
- Jones KD, Couldwell WT, Hinton DR, Su Y, He S, Anker L, Law RE (1994) Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205(3):1681–1687
- Bouterfa HL, Sattelmeyer V, Czub S, Vordermark D, Roosen K, Tonn JC (2000) Inhibition of Ras farnesylation by lovastatin leads to downregulation of proliferation and migration in primary cultured human glioblastoma cells. *Anticancer Res* 20(4):2761–2771
- Jiang Z, Zheng X, Lytle RA, Higashikubo R, Rich KM (2004) Lovastatin-induced up-regulation of the BH3-only protein, Bim, and cell death in glioblastoma cells. *J Neurochem* 89(1):168–178. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02319.x
- Obara S, Nakata M, Takeshima H, Kuratsu J, Maruyama I, Kitajima I (2002) Inhibition of migration of human glioblastoma cells by cerivastatin in association with focal adhesion kinase (FAK). *Cancer Lett* 185(2):153–161
- Gliemroth J, Zulewski H, Arnold H, Terzis AJ (2003) Migration, proliferation, and invasion of human glioma cells following treatment with simvastatin. *Neurosurg Rev* 26(2):117–124
- Wu H, Jiang H, Lu D, Xiong Y, Qu C, Zhou D, Mahmood A, Chopp M (2009) Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis. *Neurosurgery* 65(6):1087–1096. doi:10.1227/01.NEU.0000360130.52812.1Ddiscussion 1096-1087
- Jacobsen W, Kuhn B, Soldner A, Kirchner G, Sewing KF, Kollman PA, Benet LZ, Christians U (2000) Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 28(11):1369–1378
- Kantola T, Kivistö KT, Neuvonen PJ (1998) Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 64(1):58–65. doi:10.1016/S0009-9236(98)90023-6
- Tapia-Pérez JH, Kirches E, Mawrin C, Firsching R, Schneider T (2011) Cytotoxic effect of different statins and thiazolidinediones on malignant glioma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 67(5):1193–1201. doi:10.1007/s00280-010-1535-2
- Yongjun Y, Shuyun H, Lei C, Xiangrong C, Zhilin Y, Yiquan K (2013) Atorvastatin suppresses glioma invasion and migration by reducing microglial MT1-MMP expression. *J Neuroimmunol* 260(1–2):1–8. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.04.020
- Ye ZC, Rothstein JD, 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(24):10767–10777
- de Groot J, Sontheimer H (2011) Glutamate and the biology of gliomas. *Glia* 59(8):1181–1189. doi:10.1002/glia.21113
- Bösel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, Megow D, Dirnagl U et al (2005) Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem* 92(6):1386–1398. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02980.x
- Vandresen-Filho S, Martins WC, Bertoldo DB, Rieger DK, Maestri M, Leal RB, Tasca CI (2016) Atorvastatin prevents glutamate uptake reduction induced by quinolinic acid via MAPKs signaling. *Neurochem Res* 41(8):2017–2028. doi:10.1007/s11064-016-1913-1
- de Saldanha da Gama FJ, Costa Carvalho P, da Fonseca CO, Liao L, Degraive WM, da Gloria da Costa Carvalho M, Yates JR, Domont GB (2011) Chemo-resistant protein expression pattern of glioblastoma cells (A172) to perillyl alcohol. *J Proteome Res* 10(1):153–160. doi:10.1021/pr100677g
- Mendes-de-Aguiar CB, Alchini R, Decker H, Alvarez-Silva M, Tasca CI, Trentin AG (2008) Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity. *J Neurosci Res* 86(14):3117–3125. doi:10.1002/jnr.21755

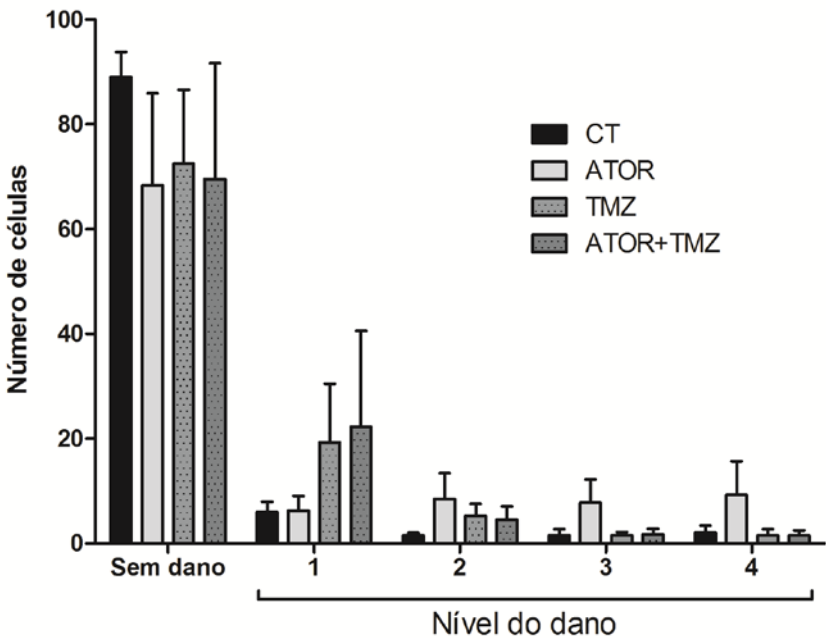
30. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1–2):55–63
31. Stepanenko AA, Dmitrenko VV (2015) Pitfalls of the MTT assay: direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* 574(2):193–203. doi:10.1016/j.gene.2015.08.009
32. Naliwaiko K, Luvizon AC, Donatti L, Chammas R, Mercadante AF, Zanata SM, Nakao LS (2008) Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway. *Chem Biol Interact* 173(2):122–128. doi:10.1016/j.cbi.2008.03.010
33. Yelskaya Z, Carrillo V, Dubisz E, Gulzar H, Morgan D, Mahajan SS (2013) Synergistic inhibition of survival, proliferation, and migration of U87 cells with a combination of LY341495 and Iressa. *PLoS One* 8(5):e64588. doi:10.1371/journal.pone.0064588
34. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV (2014) In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp* (88):e51046. doi:10.3791/51046
35. Molz S, Decker H, Oliveira IJ, Souza DO, Tasca CI (2005) Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem Res* 30(1):83–89
36. Shapiro BM (1970) Regulation of glutamine synthetase by enzyme catalyzed structural modification. *Angew Chem Int Ed Engl* 9(9):670–678. doi:10.1002/anie.197006701
37. Vandresen-Filho S, Martins WC, Bertoldo DB, Mancini G, Herculano BA, de Bem AF, Tasca CI (2013) Atorvastatin prevents cell damage via modulation of oxidative stress, glutamate uptake and glutamine synthetase activity in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. *Neurochem Int* 62(7):948–955. doi:10.1016/j.neuint.2013.03.002
38. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275
39. Schousboe A, Waagepetersen HS (2005) Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. *Neurotox Res* 8(3–4):221–225
40. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(6):479–489
41. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109(1):93–108. doi:10.1007/s00401-005-0991-y
42. Westphal M, Lamszus K (2011) The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* 12(9):495–508. doi:10.1038/nrn3060
43. Sławińska-Brych A, Zdzisińska B, Kandfer-Szerszeń M (2014) Fluvastatin inhibits growth and alters the malignant phenotype of the C6 glioma cell line. *Pharmacol Rep* 66(1):121–129. doi:10.1016/j.pharep.2014.01.002
44. Yanae M, Tsubaki M, Satou T, Itoh T, Imano M, Yamazoe Y, Nishida S (2011) Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranylpyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* 30:74. doi:10.1186/1756-9966-30-74
45. Mercurio S, Padovani L, Colin C, Carré M, Tchoghandjian A, Scavarda D, Lambert S, Baeza-Kallee N et al (2013) Evidence for new targets and synergistic effect of metronomic celecoxib/fluvastatin combination in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol Commun* 1:17. doi:10.1186/2051-5960-1-17
46. Jiang P, Mukthavaram R, Mukthavaram R, Chao Y, Bharati IS, Fogal V, Pastorino S, Cong X et al (2014) Novel anti-glioblastoma agents and therapeutic combinations identified from a collection of FDA approved drugs. *J Transl Med* 12:13. doi:10.1186/1479-5876-12-13
47. Afshordel S, Kern B, Clasohm J, König H, Priester M, Weissenberger J, Kögel D, Eckert GP (2015) Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation—impact of Ras-/Rho-prenylation. *Pharmacol Res* 91:69–77. doi:10.1016/j.phrs.2014.11.006
48. Garay T, Juhász E, Molnár E, Eisenbauer M, Czirók A, Dekan B, László V, Hoda MA et al (2013) Cell migration or cytokinesis and proliferation?—revisiting the “go or grow” hypothesis in cancer cells in vitro. *Exp Cell Res* 319(20):3094–3103. doi:10.1016/j.yexcr.2013.08.018
49. Koren MJ, Hunninghake DB, Investigators A (2004) Clinical outcomes in managed-care patients with coronary heart disease treated aggressively in lipid-lowering disease management clinics: the alliance study. *J Am Coll Cardiol* 44(9):1772–1779. doi:10.1016/j.jacc.2004.07.053
50. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR et al (2001) Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 285(13):1711–1718
51. Murinson BB, Haughey NJ, Maragakis NJ (2012) Selected statins produce rapid spinal motor neuron loss in vitro. *BMC Musculoskelet Disord* 13:100. doi:10.1186/1471-2474-13-100
52. Bababeygy SR, Polevaya NV, Youssef S, Sun A, Xiong A, Prugpichailers T, Veeravagu A, Hou LC et al (2009) HMG-CoA reductase inhibition causes increased necrosis and apoptosis in an in vivo mouse glioblastoma multiforme model. *Anticancer Res* 29(12):4901–4908
53. Yang PM, Liu YL, Lin YC, Shun CT, Wu MS, Chen CC (2010) Inhibition of autophagy enhances anticancer effects of atorvastatin in digestive malignancies. *Cancer Res* 70(19):7699–7709. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1626
54. Misirkic M, Janjetovic K, Vucicevic L, Tovilovic G, Ristic B, Vilimanovich U, Harhaji-Trajkovic L, Sumarac-Dumanovic M et al (2012) Inhibition of AMPK-dependent autophagy enhances in vitro anti-glioma effect of simvastatin. *Pharmacol Res* 65(1):111–119. doi:10.1016/j.phrs.2011.08.003
55. Zhang ZS, Wang J, Shen YB, Guo CC, Sai KE, Chen FR, Mei X, Han FU et al (2015) Dihydroartemisinin increases temozolomide efficacy in glioma cells by inducing autophagy. *Oncol Lett* 10(1):379–383. doi:10.3892/ol.2015.3183
56. Zou Y, Wang Q, Li B, Xie B, Wang W (2014) Temozolomide induces autophagy via ATM-AMPK-ULK1 pathways in glioma. *Mol Med Rep* 10(1):411–416. doi:10.3892/mmr.2014.2151
57. Ye ZC, Sontheimer H (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 59(17):4383–4391
58. de Groot JF, Liu TJ, Fuller G, Yung WK (2005) The excitatory amino acid transporter-2 induces apoptosis and decreases glioma growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 65(5):1934–1940. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3626
59. Rzeski W, Turski L, Ikonomidou C (2001) Glutamate antagonists limit tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11):6372–6377. doi:10.1073/pnas.091113598
60. Walczak K, Deneka-Hannemann S, Jarosz B, Zgrajka W, Stoma F, Trojanowski T, Turski WA, Rzeski W (2014) Kynurenic acid inhibits proliferation and migration of human glioblastoma T98G cells. *Pharmacol Rep* 66(1):130–136. doi:10.1016/j.pharep.2013.06.007
61. Ishiuchi S, Yoshida Y, Sugawara K, Aihara M, Ohtani T, Watanabe T, Saito N, Tsuzuki K et al (2007) Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation. *J Neurosci* 27(30):7987–8001. doi:10.1523/JNEUROSCI.2180-07.2007
62. Lyons SA, Chung WJ, Weaver AK, Ogunrinu T, Sontheimer H (2007) Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. *Cancer Res* 67(19):9463–9471. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2034
63. Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T (2003) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase

- inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci* 23(35):11104–11111
64. Gutierrez-Vargas JA, Muñoz-Manco JI, Garcia-Segura LM, Cardona-Gómez GP (2014) GluN2B N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mediates atorvastatin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 92(11):1529–1548. doi:10.1002/jnr.23426
  65. Merla R, Ye Y, Lin Y, Manickavasagam S, Huang MH, Perez-Polo RJ, Uretsky BF, Birnbaum Y (2007) The central role of adenosine in statin-induced ERK1/2, Akt, and eNOS phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3):H1918–H1928. doi:10.1152/ajpheart.00416.2007
  66. Stepulak A, Luksch H, Gebhardt C, Uckermann O, Marzahn J, Siffringer M, Rzeski W, Staufner C et al (2009) Expression of glutamate receptor subunits in human cancers. *Histochem Cell Biol* 132(4):435–445. doi:10.1007/s00418-009-0613-1
  67. Stepulak A, Siffringer M, Rzeski W, Endesfelder S, Gratopp A, Pohl EE, Bittigau P, Felderhoff-Mueser U et al (2005) NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43):15605–15610. doi:10.1073/pnas.0507679102
  68. Yamaguchi F, Hirata Y, Akram H, Kamitori K, Dong Y, Sui L, Tokuda M (2013) FOXO/TXNIP pathway is involved in the suppression of hepatocellular carcinoma growth by glutamate antagonist MK-801. *BMC Cancer* 13:468. doi:10.1186/1471-2407-13-468
  69. Abdul M, Hoosein N (2005) N-methyl-D-aspartate receptor in human prostate cancer. *J Membr Biol* 205(3):125–128. doi:10.1007/s00232-005-0777-0
  70. Kitabatake T, Moaddel R, Cole R, Gandhari M, Frazier C, Hartenstein J, Rosenberg A, Bernier M et al (2008) Characterization of a multiple ligand-gated ion channel cellular membrane affinity chromatography column and identification of endogenously expressed receptors in astrocytoma cell lines. *Anal Chem* 80(22):8673–8680. doi:10.1021/ac8016407
  71. North WG, Gao G, Memoli VA, Pang RH, Lynch L (2010) Breast cancer expresses functional NMDA receptors. *Breast Cancer Res Treat* 122(2):307–314. doi:10.1007/s10549-009-0556-1
  72. Herner A, Sauliunaite D, Michalski CW, Erkan M, De Oliveira T, Abiatari I, Kong B, Esposito I et al (2011) Glutamate increases pancreatic cancer cell invasion and migration via AMPA receptor activation and Kras-MAPK signaling. *Int J Cancer* 129(10):2349–2359. doi:10.1002/ijc.25898
  73. Stepulak A, Siffringer M, Rzeski W, Brocke K, Gratopp A, Pohl EE, Turski L, Ikonomidou C (2007) AMPA antagonists inhibit the extracellular signal regulated kinase pathway and suppress lung cancer growth. *Cancer Biol Ther* 6(12):1908–1915
  74. de Groot JF, Piao Y, Lu L, Fuller GN, Yung WK (2008) Knockdown of GluR1 expression by RNA interference inhibits glioma proliferation. *J Neuro-Oncol* 88(2):121–133. doi:10.1007/s11060-008-9552-2
  75. Wang Q, Zengin A, Deng C, Li Y, Newell KA, Yang GY, Lu Y, Wilder-Smith EP et al (2009) High dose of simvastatin induces hyperlocomotive and anxiolytic-like activities: the association with the up-regulation of NMDA receptor binding in the rat brain. *Exp Neurol* 216(1):132–138. doi:10.1016/j.expneurol.2008.11.016



Os resultados referentes ao efeito da atorvastatina sobre o dano ao DNA e potencial de membrana mitocondrial e a avaliação do envolvimento de vias de sinalização intracelular no efeito da atorvastatina estão descritos abaixo.

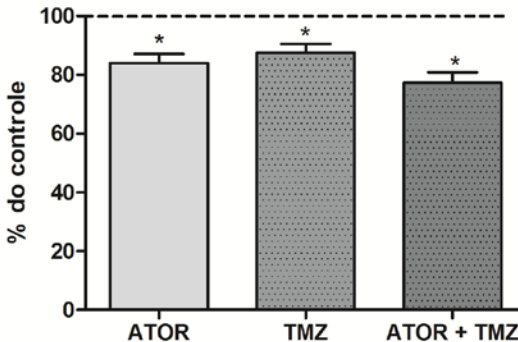
Com o intuito de avaliar a capacidade da ATOR em acarretar danos ao DNA, as células de glioma humano A172 foram plaqueadas e após confluência tratadas por 48 horas com ATOR (10  $\mu$ M), TMZ (500  $\mu$ M) e ATOR (10  $\mu$ M) + TMZ (500  $\mu$ M). Então, as células foram fixadas e as lâminas analisadas. Observamos que a ATOR, a TMZ, ou a combinação dos dois fármacos, não promoveu dano significativo ao DNA em nenhum dos níveis avaliados (Figura 9).



**Figura 1: Avaliação do efeito do tratamento com ATOR no dano ao DNA:** As células de glioma A172 foram tratadas com ATOR (10  $\mu$ M), TMZ (500  $\mu$ M) e ATOR (10  $\mu$ M) + TMZ (500  $\mu$ M) durante 48 horas.

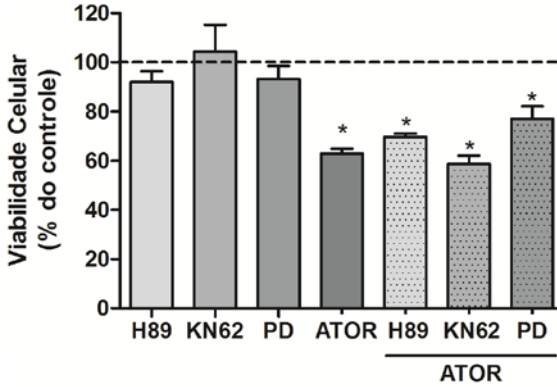
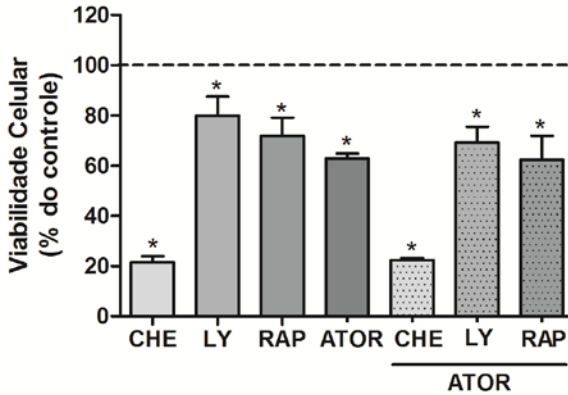
Então foram fixadas, coradas e analisadas em microscópio óptico. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. n= 4 experimentos independentes.

Visto que, em outro trabalho do nosso grupo, foi demonstrado a ATOR causa aumento nos níveis de apoptose (Oliveira *et al.*, 2017), analisamos o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em células A172 submetidas ao mesmo protocolo de tratamento. Verificamos que a ATOR é capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial (16%) aos mesmos níveis que a TMZ (13%) e que a co-incubação das duas apresenta efeito similar (23%), sem diferença estatística entre os grupos (Figura 10).



**Figura 2: Avaliação do efeito do tratamento com ATOR no potencial de membrana mitocondrial:** As células de glioma A172 foram tratadas com ATOR (10  $\mu$ M), TMZ (500  $\mu$ M) e ATOR (10  $\mu$ M) + TMZ (500  $\mu$ M) durante 48 horas. Então foram lavadas, e incubadas com TMRE. O potencial de membrana mitocondrial é proporcional à fluorescência emitida pela sonda. Os dados foram expressos em porcentagem do controle que foi considerado com o 100% e expresso como a linha pontilhada. n= 6 experimentos independentes; \*  $p < 0,05$ .

Foram investigadas as possíveis vias de sobrevivência celular envolvidas no efeito citotóxico da ATOR. Observamos que a inibição farmacológica das proteínas PKA, CaMKII e MEK, com os inibidores seletivos, H89, KN62 e PD98059 respectivamente, não acarreta alteração na viabilidade das células de glioma A172 (Figura 11a). Além disso, a pré-incubação destes inibidores não altera a citotoxicidade induzida pela ATOR (Figura 11a). Já o tratamento com os inibidores CHE, LY294002 e RAP, inibindo as proteínas PKC, PI3K e mTOR respectivamente, diminuiu significativamente a viabilidade celular, mesmo sem a presença da ATOR (Figura 11b). Ainda, adição de ATOR após a pré-incubação com CHE, LY294002 e RAP parece não alterar o efeito citotóxico induzido pelos inibidores (Figura 11b).

**a****b**

**Figura 3: Avaliação do envolvimento de vias de sobrevivência celular na citotoxicidade induzida pela ATOR:** As células de glioma A172 foram pré-incubadas com os inibidores **(a.** H89 - 3  $\mu$ M, KN-92 - 10  $\mu$ M, PD98059 - 10  $\mu$ M **b.** CHE - 3  $\mu$ M, LY294002 - 10  $\mu$ M e RAP - 1  $\eta$ M) por 30 minutos e então tratadas com ATOR (10  $\mu$ M) durante 48 horas. A viabilidade celular foi obtida pelo ensaio de redução do MTT. O potencial de membrana mitocondrial é proporcional à fluorescência emitida pela sonda. Os dados foram expressos porcentagem do controle que foi considerado com o 100% e expresso como a linha pontilhada. n= 3 experimentos independentes; \*  $p < 0,05$ .



## CAPÍTULO II

### *Estudo do efeito citotóxico da guanosina e envolvimento dos sistemas adenosinérgico e glutamatérgico e da associação com temozolomida em células de glioma humano A172.*

Este capítulo contém os resultados relacionados ao objetivo específico II desta tese. Os resultados referentes à toxicidade da guanosina associada à temozolomida e envolvimento de receptores de neurotransmissores estão apresentados como anexos (Anexos A e B do Capítulo II, respectivamente).

O anexo A é referente ao artigo científico intitulado: “*Guanosine promotes cytotoxicity via adenosine receptors and induces apoptosis in temozolomide-treated in A172 glioma cells*”, submetido no periódico *Purinergic Signaling*.

O anexo B é referente ao manuscrito intitulado: “*Guanosine decreases migration and proliferation and induces DNA damage in temozolomide-treated a172 glioma cells*”, a ser submetido ao periódico *Cellular and Molecular Neurobiology*.



ANEXO A – CAPÍTULO II



## Purinergic Signalling

# GUANOSINE PROMOTES CYTOTOXICITY VIA ADENOSINE RECEPTORS AND INDUCES APOPTOSIS IN TEMOZOLOMIDE-TREATED A172 GLIOMA CELLS

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PUSI-D-17-00003R1	
<b>Full Title:</b>	GUANOSINE PROMOTES CYTOTOXICITY VIA ADENOSINE RECEPTORS AND INDUCES APOPTOSIS IN TEMOZOLOMIDE-TREATED A172 GLIOMA CELLS	
<b>Article Type:</b>	Original Research	
<b>Keywords:</b>	A172 glioma cells; guanosine; temozolomide; cytotoxicity; glutamate; adenosine.	
<b>Corresponding Author:</b>	Carla Inês Tasca, Ph.D. Universidade Federal de Santa Catarina BRAZIL	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal de Santa Catarina	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Karen Andrinéia de Oliveira, M.D.	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Order of Authors:</b>	Karen Andrinéia de Oliveira, M.D.	
	Tharine Dal-Cim, PhD	
	Flávia Garcia Lopes, Bachelor of Biological Sciences	
	Cláudia Beatriz Nedel, PhD	
	Carla Inês Tasca, Ph.D.	
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>		
<b>Funding Information:</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Universal/2012; INCT)	Dr. Carla Inês Tasca
	Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (NENASC/PRONEX)	Dr. Carla Inês Tasca
	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PVE-052/2012)	Dr. Carla Inês Tasca
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Universal/2013)	PhD Cláudia Beatriz Nedel
	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PVE post-doctoral fellowship)	PhD Tharine Dal-Cim
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq productivity fellowship)	Dr. Carla Inês Tasca

[Click here to view linked References](#)

**GUANOSINE PROMOTES CYTOTOXICITY VIA ADENOSINE RECEPTORS AND INDUCES  
APOPTOSIS IN TEMOZOLOMIDE-TREATED A172 GLIOMA CELLS**

Karen A. Oliveira<sup>1</sup>; Tharine A. Dal-Cim<sup>3</sup>; Flávia G. Lopes<sup>4</sup>; Cláudia B. Nedel<sup>3,4</sup>;

Carla I. Tasca<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurociências; <sup>4</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

**Running Title:** Guanosine promotes cytotoxicity in A172 glioma

**Corresponding author:**

Carla Inês Tasca

Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC

Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil

Telephone number: +55-48 3721-5046

E-mail address: carla.tasca@ufsc.br

**Acknowledgements**

This study was supported by grants from the Brazilian funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) - (Universal/2012; INCT), FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) - (NENASC/PRONEX) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) - (PVE-052/2012) to C.I.T., and CNPq (Universal/2013) to C.B.N. T.D.-C. was recipient of a CAPES/PVE post-doctoral fellowship and C.I.T. is recipient of CNPq productivity fellowship.

## Abstract

1 Gliomas are a malignant tumor group whose patients have survival rates around 12 months.  
2  
3 Among the treatments are the alkylating agents as temozolomide (TMZ), although gliomas have shown  
4 multiple resistance mechanisms for chemotherapy. Guanosine (GUO) is an endogenous nucleoside  
5 involved in extracellular signaling that presents neuroprotective effects and also shows the effect of  
6 inducing differentiation in cancer cells. The chemotherapy allied to adjuvant drugs are being suggested as  
7 a novel approach in gliomas treatment. In this way, this study evaluated whether GUO presented  
8 cytotoxic effects on human glioma cells, as well as GUO effects in association with a classical  
9 chemotherapeutic compound, TMZ. Classical parameters of tumor aggressiveness, as alterations on cell  
10 viability, type of cell death, migration and parameters of glutamatergic transmission were evaluated.  
11  
12 GUO (500 and 1000  $\mu$ M) decreases the A172 glioma cells viability after 24, 48 or 72 hours of treatment.  
13  
14 TMZ alone or GUO plus TMZ also reduced glioma cells viability similarly. GUO combined with TMZ  
15 showed a potentiation effect of increasing apoptosis in A172 glioma cells and a similar pattern was  
16 observed in reducing mitochondrial membrane potential. GUO *per se* did not elevate the acidic vesicular  
17 organelles occurrence, but TMZ or GUO plus TMZ increased this autophagy hallmark. GUO did not alter  
18 glutamate transport *per se*, but it prevented TMZ-induced glutamate release. GUO or TMZ did not alter  
19 glutamine synthetase activity. Pharmacological blockade of glutamate receptors did not change GUO  
20 effect on glioma viability. GUO cytotoxicity was partially prevented by adenosine receptors (A<sub>1</sub>R and  
21 A<sub>2A</sub>R) ligands. These results point to a cytotoxic effect of GUO on A172 glioma cells and suggest an  
22 anticancer effect of GUO as a putative adjuvant treatment, whose mechanism needs to be unraveled.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 **Keywords:** A172 glioma cells, guanosine, temozolomide, cytotoxicity, glutamate, adenosine.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Abbreviations:** A<sub>1</sub>R, adenosine A<sub>1</sub> receptors; A<sub>2A</sub>R, adenosine A<sub>2A</sub> receptors; AdoR, adenosine receptors; AMPAR,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; AVOs, acidic vesicular organelles; BK, large (big) conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels; CGS 21680, 4-[2-[[6-Amino-9-(N-ethyl- $\beta$ -D-ribofuranuronamidosyl)-9H-purin-2-yl]amino]ethyl]benzenepropanoic acid hydrochloride; DIPY, dipyridamole; DL-TBOA, DL-threo- $\beta$ -Benzyloxyaspartic acid; DNQX, 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione; DPCPX, Dipropylcyclopentylxanthine; EAAT, excitatory aminoacids transporters; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FBS, fetal bovine serum; FCCP, Carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxy phenylhydrazone; GAMS,  $\gamma$ -D-Glutamylaminomethylsulphonic acid; GluR, glutamate receptors; GUO, Guanosine; KAR, kainate receptor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCPG, (RS)- $\alpha$ -Methyl-4-carboxyphenylglycine; mGluR, metabotropic glutamate receptor; MK-801, dizolcipine; MTT, 3-(4,5-Diamethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; ROS, reactive oxygen species; SAS, sulfasalazin; TMRE, tetramethylrhodamine ethyl ester; TMZ, temozolomide; Xc<sup>-</sup> system, ZM241385, 4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol.



## Introduction

1  
2  
3  
4 Gliomas are considered the most aggressive type of brain tumors. The origin of this type of cancer  
5  
6 can be related to changes in glial cells or their progenitors [1]. The most common therapies involve  
7  
8 surgical resection, chemotherapy and/or radiotherapy, however, the prognosis remains low and the  
9  
10 survival rates are around 12 to 15 months. The main approach used as chemotherapy is the administration  
11  
12 of alkylating drugs that inhibit DNA replication and evoke the activation of apoptosis cascades [2,3].  
13  
14 Among the most clinically used chemotherapeutic compounds is the Temozolomide (TMZ) that have  
15  
16 been showing efficacy in early diagnosed gliomas [4]. TMZ is an alkylating agent that is absorbed and in  
17  
18 physiological pH of blood circulation is transformed to its active metabolite, 3-methyl-(5-ethyl-1-  
19  
20 yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC), which causes DNA damage through DNA methylation and  
21  
22 subsequent cell cycle arrestment and cell death [5]. The enzyme N-alkylpurine DNA glycosylase (APGN)  
23  
24 is able to repair this DNA methylation, thus causing TMZ resistance in glioma cells [6]. This repair  
25  
26 mechanism allied to other resistance mechanisms are responsible for the low prognosis observed in  
27  
28 gliomas [7] and point to the urgency of developing additional or adjuvant therapies to treat gliomas.  
29

30  
31 Allied to resistance mechanisms, putative changes in the transmission system evoked by the main  
32  
33 excitatory neurotransmitter, the amino acid glutamate, might occur in glioma cells, thus favoring tumor  
34  
35 growth. It has been shown that there is increased glutamate release, through cystine-glutamate exchanger  
36  
37 (Xc<sup>-</sup> system) activity and decreased glutamate uptake through reduction of the excitatory amino acids  
38  
39 transporters (EAAT) expression in glioma cells [8,9]. Additionally, it has been shown that glutamate  
40  
41 receptors (GluR) antagonists may reduce the proliferation and motility of cancer cells [10]. In this  
42  
43 context, the search for molecules that can modulate glutamatergic transmission is considered an  
44  
45 interesting treatment strategy.

46  
47 Guanosine (GUO) is an endogenous guanine-derived nucleoside involved in extracellular  
48  
49 signaling that presents the ability to modulate glutamatergic system activity [11,12]. In this regard, GUO  
50  
51 exerts neuroprotective effects against glutamate-induced cell damage or ischemia, through activation of  
52  
53 intracellular signaling pathways related to cell survival as the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and  
54  
55 mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) [13,14]. GUO also  
56  
57 modulates glutamate transporters activity, by preventing the decrease in glutamate uptake and the  
58  
59 increased glutamate release on *in vitro* models of ischemia [15,14,16,17]. A selective receptorial protein  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 to GUO has been suggested, although it has not yet been cloned (for a review see,[12]). However, the  
2 neuroprotective effect of GUO seems to involve the modulation of adenosine receptors (AdoR) [14]  
3 and/or the activation of the large (big) conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels (BK) [18]. Additionally,  
4 the neuroprotective effect of GUO is related to the nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) inhibition and  
5 antioxidant and anti-inflammatory effects [19,17]. There are few studies regarding GUO effects in cancer.  
6  
7 A study of an anticancer effect of a purine nucleoside analog, sulfinosine (an oxidized form of 6-  
8 thioguanosine) demonstrates an induction of caspase-dependent apoptotic cell death and autophagy in  
9 glioma cells. Additionally, sulfinosine increases the reactive oxygen species (ROS) and diminishes the  
10 antioxidant peptide glutathione levels [20]. In cancer cells, the induction of differentiation is also related  
11 to impairment in malignancy. It has been shown that GUO induces melanoma cells differentiation  
12 through protein kinase C (PKC)/ERK pathway, increasing dendritogenesis and melanogenesis and  
13 decreasing cell motility [21].  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

24 The study of drugs combination approach that may enhance the anticancer potential of drugs with  
25 different mechanisms of action, improving the survival rates and elucidating better strategies in cancer  
26 therapy, it is very important. Therefore this study is testing if GUO shows the potential cytotoxic effect  
27 and comparing it to TMZ effect, besides analyzing GUO and TMZ combination effects on classical  
28 parameters of tumor aggressiveness.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Material and Methods

**Cell culture:** The glioma cell line A172 (the cell line was kind gift from Dr. G. Lenz from Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium and nutrient mixture F12 (DMEM-F12, Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab), in 25 cm<sup>2</sup> culture flasks, at 37° C humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, as previously reported [22]. For the biochemical analysis, when reached confluence, A172 cells were trypsinized (Trypsin/EDTA, 0.05%; Gibco) and plated in 24 or 96 wells plates (3.5 x 10<sup>5</sup> or 0.5 x 10<sup>5</sup>, respectively).

**Cell treatment:** A172 cells were plated in 24 or 96 wells plates. After confluence, the cells were treated with guanosine (GUO 50-1000 μM in time-course/concentration curves, or 500 μM for other analyses) (Sigma), TMZ (500 μM) (Tocris) for 48 hours. In order to assess GUO mechanism of action, adenosine and glutamate receptors agonists and antagonists, purine nucleosides and glutamate transporters inhibitors were incubated 30 minutes before GUO and maintained during 48 hours treatment. Drugs used were as followed: the adenosine-metabolizing enzyme, Adenosine deaminase (ADA - 0.5 U/mL), the equilibrative purines nucleosides transporter inhibitor, dipyridamole (DIPY - 10 μM), the broad spectrum inhibitor of excitatory amino acids transporters (EAATs), DL-threo-β-Benzyloxyaspartic acid (DL-TBOA - 100 μM); the X<sub>c</sub><sup>-</sup> system inhibitor, sulfasalazin (SAS - 300 μM); the glutamate receptor subtypes α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) and kainate receptor (KAR) antagonist, 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX - 1 μM); the glutamate subtype N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonist, dizocilpine (MK-801 - 1 μM); KAR antagonist, γ-D-Glutamylaminomethylsulphonic acid (GAMS - 1 μM); metabotropic glutamate receptor (mGluR) antagonist, (RS)-α-Methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG - 10 μM); adenosine A<sub>1</sub> receptor (A<sub>1</sub>R) antagonist, Dipropylcyclopentylxanthine (DPCPX - 100 nM); adenosine A<sub>2A</sub> receptor (A<sub>2A</sub>R) inverse agonist, 4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (ZM241385 - 50 nM); A<sub>2A</sub>R agonist – 4-[2-[[6-Amino-9-(N-ethyl-β-D-ribofuranuronamidoyl)-9H-purin-2-yl]amino]ethyl]benzenepropanoic acid hydrochloride (CGS 21680 – 30 nM). During treatment, cells were incubated in serum-free DMEM-F12, including control groups (CT). Biochemical analyses were carried out after elapsed time of treatment.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
**Viability analysis:** Cell viability was evaluated through cells capacity to reduce 3-(4,5-Diamethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) as previously described [23]. In this assay, viable cells convert water-soluble yellow MTT to water-insoluble blue MTT formazan. Thus, MTT formazan production, identified by optical density, is assumed to be proportional to the number of viable cells. Cells were incubated with MTT (0.2 mg/mL) in PBS for 2 hours at 37°C. The formazan produced was solubilized by replacing the medium with 100 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO), resulting in a colored compound from which optical density was measured in an ELISA reader (550 nm).

14  
15  
16  
17  
18  
19  
The Trypan blue exclusion assay was also applied [24]. After time-treatment cells were stained with Trypan blue and counted in a hemocytometer. The percentage of viable cells was calculated: % viable cells = (number of viable cells/ number of total cells) x 100.

20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
The CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability assay was also used to access the cell viability. ATP quantification was assayed as an indicator of metabolically active cells. According to the manufacturer's recommendations, the cells were maintained at room temperature for 30 minutes. Briefly, the CellTiter-Glo® reagents were added and the plate incubated on an orbital shaker for 2 minutes. The luminescent signal was stabilized for 10 minutes at room temperature and the total luminescence recorded.

32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
**Wound Healing assay:** In order to analyze changes in cell migration, the wound healing assay was carried out according to previous studies [21,25]. Briefly, cells were plated in 6-well plates, after 24 hours a Pippete-200 tip was used to scrap the dish surface to generate the "wound" and the medium was replaced by FBS-free medium containing drugs. Phase contrast images were obtained using a 10X objective lens in an inverted microscope at 0, 24 and 48 hours. To each experiment, a scratch was carried out in five replicates and the experiment was repeated three times. The gap width was calculated by 10 measurements from each scratch to obtain the width average. Each measurement was taken from the left edge to the right edge of the scratch, going from the top to the bottom of the image using Image J software. The average of the width was expressed in arbitrary units.

52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
**Acridine Orange staining:** To identify the presence of acidic vesicular organelles (AVOs), cells were plated in 24 well dishes. After 24 hours the cells were treated. Elapsed 48 hours of treatment, the cells were washed with PBS and incubated with Acridine Orange (Sigma) 10 µg/mL for 10 minutes at room temperature. Then, the solution was replaced by PBS and the cells were analyzed under an inverted

1 fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 40 CFL, capture system AxioCamMRc). Depending on their  
2 acidity, the autophagic lysosomes appear as orange/red AVOs, while cytoplasm and nuclei are green. The  
3 analyses were carried out using a 490 nm band-pass blue excitation and a 515 nm long pass barrier filters.  
4 In order to quantify AVOs presence, cells were counted through flow cytometry. After treatment, cells  
5 were PBS washed and incubated with Acridine Orange 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 15 minutes. Then the cells were  
6 trypsinized, centrifuged at 220 x g and resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of PBS-EDTA – 0.2  $\mu\text{M}$ . The cells were  
7 sorted by FACSCanto II flow cytometer and result processed on Flowing Software 2.  
8  
9  
10  
11  
12  
13

14  
15  
16 **Apoptosis and Necrosis analysis:** To analyze the effect of ATOR and TMZ on apoptosis or necrosis  
17 levels in glioma cells, the Annexin V FITC assay kit (Millipore) was used in flow cytometry. The kit  
18 detects the phosphatidylserine exposure on the outer layer of the cell membrane. Annexin V FITC  
19 conjugated binds to phosphatidylserine exposed in apoptotic cells. Propidium Iodide binds to DNA in  
20 cells with compromised cell membrane indicating necrotic cells. After treatment,  $1 \times 10^5$  cells were  
21 trypsinized, centrifuged at 1,500 rpm and washed in cold PBS, then resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of binding  
22 buffer. The cells were stained with FITC-conjugated Annexin V and propidium iodide reagent in  
23 concentrations and time recommended by the manufacturer. The cells were sorted by FACSCanto II flow  
24 cytometer and result processed on Flowing Software 2.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 **Measurement of Mitochondrial Membrane Potential:** after treatment, the cells were loaded with the  
37 mitochondrial selective fluorescent dye, tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, 100 nM) for 30 min at  
38 37°C [26], for analyzing the mitochondrial membrane potential after the incubation with GUO and TMZ.  
39 Fluorescence was measured using wavelengths of excitation and emission of 550 and 590 nm,  
40 respectively. Carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxy phenylhydrazone (FCCP), a mitochondrial uncoupler,  
41 was used as positive control to fluorescence emission.  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

50 **Glutamine Synthetase activity:** The assay of the glutamine synthetase enzyme activity has been adapted  
51 from Shapiro [27] as Vandresen-Filho *et al.* [28]. For evaluating drugs effects on glutamine synthetase  
52 activity in human glioma cells A172 after treatment, the cells were harvested and washed in PBS. Then,  
53 the cells were incubated for 15 minutes in 200  $\mu\text{L}$  of imidazole – HCl buffer (80 mM, pH 7.0) and  
54 homogenized. The assay mixture contained: 80 mM imidazole–HCl buffer, 30mM glutamine, 3mM  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 MnCl<sub>2</sub>, 30mM hydroxylamine-HCl, 20mM sodium arsenate, 0.4mM ADP and 50µl of the cells  
2 homogenate. The reaction was stopped after 30 min at 37 °C through the addition of 100 µL of a mixture  
3 containing 4/1/0.5/6.5 (v/v/v/v) of 10% (w/v) ferric chloride, 24% (w/v) trichloroacetic acid, 6M HCl, and  
4 water. The reaction product,  $\gamma$ -glutamylhydroxamate, was measured at 540 nm using a microplate reader  
5 and converted to the amount of product formed through comparison with a standard curve. The enzyme  
6 activity was expressed as a percentage of control.  
7  
8  
9  
10

11  
12  
13 **L-[<sup>3</sup>H]glutamate transport:** To analyze this parameter, cells were concomitantly plated for transport  
14 assays and cell counting, for experiment normalization. After drugs incubation, the culture medium was  
15 removed and the cells were incubated in Hanks buffer saline solution (HBSS – composition in mM: 1.3  
16 CaCl<sub>2</sub>, 137 NaCl, 5 KCl, 0.65 MgSO<sub>4</sub>, 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 glucose and 5 HEPES) (pH 7.2) for  
17 15 minutes at 37°C. Excitatory amino acids release was assessed by adding 0.33 µCi/ml of L-  
18 [<sup>3</sup>H]glutamate (American Radiolabeled Chemicals - ARC), plus L-glutamate to reach a final  
19 concentration of 100 µM and incubated for 7 minutes. The reaction was stopped with three ice-cold  
20 HBSS washes. Cells were incubated in HBSS for 15 minutes in 300 µL at 37°C and the medium was  
21 collected to measure L-[<sup>3</sup>H]glutamate release. The cells were lysed in the NaOH 0.1 N/SDS 0.1 %  
22 solution overnight and the L-[<sup>3</sup>H]glutamate content was used to assess the neurotransmitter uptake,  
23 determined through scintillation counting [29]. Cells that were concomitantly plated were counted in  
24 hemocytometer and experiment was normalized as fmol of glutamate per number of viable cells after  
25 treatment.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 **Protein measurement:** Protein content was evaluated by using the method of Lowry [30] and bovine  
43 serum albumin (Sigma) was used as a standard.  
44  
45  
46  
47

48 **Statistical analysis:** Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) when treated groups  
49 were compared to the control group only, or two-way ANOVA when the comparisons assessed different  
50 times and concentrations groups and followed by Student-Newman-Keuls test. The software used were  
51 GraphPad Prism 4.0 for one-way analysis or Statistica 7.0 for two-way analysis, considering significance  
52 level p<0.05.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Results

### Cellular viability evaluations

1  
2  
3  
4  
5  
6 Firstly, GUO time-course and concentration curves were carried out in order to evaluate the  
7 nucleoside effect on A172 glioma cells growing curve. The A172 cells were treated with GUO in a  
8 concentration range from 50 to 1000  $\mu\text{M}$  for 24, 48 or 72 hours and cell viability was assessed by the  
9 MTT assay (Fig. 1a). GUO concentrations of 50 or 100 did not alter glioma cells growing curve. GUO  
10 500 or 1000 decreased A172 cells viability. This pattern of reduction of cell viability was observed also at  
11 48 and 72 hours. Therefore, to the subsequent experiments, it was used the concentration of 500  $\mu\text{M}$  GUO  
12 at 48 hours of treatment (Fig. 1b).  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

20 An evaluation of TMZ effect and its association with GUO was carried out in order to compare the  
21 effects of these drugs and analyze a possible interaction on cytotoxicity to glioma cells (Fig. 2). 200  $\mu\text{M}$   
22 TMZ was initially tested to study TMZ effect on A172 cells viability however, it did not change the  
23 glioma cells viability (data not shown). The A172 cells were then treated for 48 hours with GUO (500  
24  $\mu\text{M}$ ), TMZ (500  $\mu\text{M}$ ) or both drugs co-incubated and tested in three different viability methods. In MTT  
25 assay, GUO or TMZ treatments showed a similar effect, reducing glioma viability to 49% and 51%,  
26 respectively. Similarly, the combined treatment of TMZ and GUO reduced cell viability to 42% and no  
27 significant difference was observed among treated groups (Fig. 2a). The Trypan Blue exclusion assay, a  
28 cell counting-based method was also applied. The percentages of viable cells were 66%, 38% and 64% to  
29 GUO, TMZ, and GUO + TMZ, respectively, being TMZ treatment significantly lower than GUO or GUO  
30 + TMZ (Fig. 2b). Cell viability was also assessed through ATP levels measurement. GUO, TMZ, or the  
31 drugs combination showed a decrease in cell viability of 56%, 55%, and 54% respectively, with no  
32 statistical difference among treatments (Fig. 2c). In this way, GUO, TMZ, or GUO + TMZ decreased  
33 A172 glioma cells viability similarly, although a higher reduction in cells number was observed in TMZ  
34 group than to GUO or GUO+TMZ. No synergistic effect was observed in the combined treatment.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

### Cell migration analysis

52 To evaluate the effects of GUO and TMZ on A172 migration capacity, a wound healing assay was  
53 carried out, with drugs treatment alone or combined (Fig. 3a, b). The distance between the edges of the  
54 gap was measured soon after the cells were scratched and 24 hours and 48 hours after scratching. At the  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

0-hour time point, there was no difference among the groups. After 24 hours, GUO (500  $\mu$ M) or TMZ (500  $\mu$ M) alone did not show any difference in cell migration, however, GUO plus TMZ inhibited the cell migration significantly related to the control group at this same time point. At the last time point, 48 hours, GUO did not alter the migration. TMZ reduced migration alone or in combination with GUO in a similar way. Thus, at 24 hours evaluation, the combined treatment (GUO + TMZ) reduced cell migration. At 48 hours evaluation, TMZ or GUO + TMZ decreased cell migration. GUO treatment alone had no effect on A172 glioma cells migration.

### Acidic Vesicular Organelles assay

Acridine orange is a cell-permeant cationic fluorescent dye which indicates the Acidic Vesicular Organelles (AVOs) presence. AVOs are considered as an indicative of autophagy since the autophagosomes and autophagolysosomes are acidic organelles. In this way, it was measured the AVOs presence after GUO, TMZ, and GUO+TMZ for 48 hours (Fig. 4a-c). Representative photomicrographs show AVOs presence and changes in cell number following GUO or TMZ treatment (Fig. 4a). Figure 4b shows representative dot plots obtained through flow cytometry. GUO did not significantly increase the AVOs staining in glioma cells. TMZ or TMZ + GUO groups showed an increase, being the percentage of events around 24% for both (Fig. 4c). Therefore, TMZ or GUO + TMZ increased autophagy similarly, with no synergistic effect in combined treatment.

### Apoptosis and Necrosis Analysis

Regarding the type of cell death caused by GUO or TMZ, it was analyzed apoptotic and necrotic cell death in cells treated with GUO, TMZ or both drugs combined, after 48 hours of treatment. GUO or TMZ alone did not significantly alter the number of apoptotic cells. GUO + TMZ treatment increased the labeling of apoptotic cells (Figs. 5a and b), suggesting an improvement in antitumor effect in this type of programmed cell death. Regarding the necrotic cell death, there were no significant changes in glioma cells treated with GUO, TMZ or both compounds (Fig. 5b).

### Mitochondrial Membrane Potential evaluation

Mitochondrial dysfunctions have been shown to participate of apoptosis cascade. In this way, we studied GUO, TMZ or drugs combination on mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) maintenance.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

GUO or TMZ alone did not show any effect. Nevertheless, GUO + TMZ combined treatment decreased the  $\Delta\Psi_m$  in approximately 23% (Fig. 5c). FCCP (10  $\mu\text{M}$ ), a mitochondrial uncoupler, decreased 38% the  $\Delta\Psi_m$  (data not shown). These data corroborate with the increased apoptotic levels observed with GUO + TMZ treatment. In this way, GUO or TMZ was not able to change apoptosis levels and  $\Delta\Psi_m$ . However, GUO + TMZ combined treatment increased apoptosis and decreased mitochondrial membrane potential.

### Analysis of glutamatergic transmission involvement

As glioma cells are supposed to release a large amount of glutamate and there is evidence showing GUO is able to modulate glutamate transport, A172 glioma cells treated with GUO and/or TMZ were assayed for glutamate uptake and release evaluation. GUO did not significantly change glutamate uptake (Fig. 6a) or release (Fig. 6b). There was a tendency of increasing glutamate uptake induced by TMZ and GUO + TMZ treatment, although no statistical significance was reached (Fig. 6a). However, TMZ significantly increased glutamate release whereas co-incubation with GUO prevented this effect (Fig. 6b).

The activity of the enzyme responsible for converting glutamate to glutamine, glutamine synthetase (GS), was also assessed in cells treated with GUO, TMZ or both compounds combined. However, no changes in GS activity were observed in glioma cells treated with GUO, TMZ, or the combination of both drugs (Fig. 6c).

A possible involvement of glutamate (excitatory amino acids) transporters (EAAT) in GUO effects was also investigated through pharmacological intervention and evaluation of glioma cells viability. Taking GUO effect on cell viability into consideration and preventing the increase of glutamate release caused by TMZ, glutamate transporter blockers were incubated for 30 minutes before GUO. Sulfasalazin (SAS, 300  $\mu\text{M}$ ), a  $X_c^-$  system inhibitor, or DL-TBOA (100  $\mu\text{M}$ ), a non-transportable broad-spectrum glutamate transporters inhibitor was tested. None of the blockers altered GUO effect, suggesting GUO did not decrease cell viability through glutamate transporters modulation (Fig. 7a).

The ionotropic glutamate receptors (iGluRs) and the metabotropic glutamate receptors (mGluRs) contribution to GUO cytotoxicity to glioma cells were also evaluated. The NMDAR antagonist MK-801 (1  $\mu\text{M}$ ) did not change glioma cells viability. Preincubation of MK-801 did not prevent the reduction in cell viability observed with GUO (Fig. 7b). DNQX (1  $\mu\text{M}$ ), a non-selective AMPA and Kainate (KA) receptors antagonist also did not change gliomas viability alone, neither co-incubated with GUO (Fig. 7b). A selective KA receptor antagonist, GAMS (1  $\mu\text{M}$ ), and a non-selective metabotropic glutamate

1 receptors antagonist, MCPG (10  $\mu$ M) were also tested (Fig. 7c). None of the antagonists altered GUO  
2 effect on decreasing cell viability, discarding the participation of glutamate receptors on GUO effect.  
3  
4

### 5 **Evaluation of adenosinergic system involvement**

6  
7 As the nucleoside adenosine regulates glutamatergic transmission and transport, and protective  
8 effects of GUO were abolished by modulating adenosine receptors (mainly A<sub>1</sub>R and A<sub>2A</sub>R), the  
9 involvement of adenosinergic system on GUO effect over A172 cells was also evaluated. The purines  
10 nucleoside transport inhibitor, dipyridamole (DIPY, 10  $\mu$ M) has no effect on cell viability. DIPY did not  
11 abolish GUO effect, pointing to an extracellular effect of GUO (Fig. 8a). In order to evaluate a  
12 dependence of GUO effect on extracellular endogenous adenosine levels, cells viability was assessed in  
13 the presence of the metabolizing adenosine enzyme, adenosine deaminase (ADA, 0.5 U/mL). ADA *per se*  
14 increased A172 cells viability as compared to control cells. The cytotoxic effect of GUO was partially  
15 prevented in the presence of ADA (Fig. 8a).  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26 Concerning to assess a putative effect of GUO on modulating adenosine receptors (AdoR) activity,  
27 AdoR ligands were incubated in the presence or absence of GUO and cell viability was evaluated.  
28 Adenosine, at the same GUO concentration used (500  $\mu$ M) did not modify glioma cells viability alone,  
29 but it prevented GUO cytotoxicity. The A<sub>2A</sub>R full agonist (CGS 21680, 30  $\eta$ M) or the A<sub>2A</sub>R inverse  
30 agonist also did not change glioma cells viability *per se*. CGS 21680 (A<sub>2A</sub>R agonist) or ZM241385 (A<sub>2A</sub>R  
31 inverse agonist) partially prevented GUO effect (Fig. 8b), indicating an A<sub>2A</sub>R involvement on GUO  
32 cytotoxicity to glioma cells.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 The involvement of adenosine A<sub>1</sub> receptor (A<sub>1</sub>R) on GUO cytotoxic effect was also evaluated by  
41 using an A<sub>1</sub>R antagonist, DPCPX (100  $\eta$ M). DPCPX alone did not change glioma cells viability.  
42 However, this A<sub>1</sub>R antagonist also partially prevented GUO effect on reducing glioma cells viability (Fig.  
43 8c). Considering the partial effect observed with both synthetic AdoR ligands, an association of these  
44 compounds on GUO effect was assessed. The incubation of A<sub>1</sub>R antagonist, DPCPX plus A<sub>2A</sub>R inverse  
45 agonist, ZM241385, promoted a slight reduction in glioma cells viability (Fig. 8c). In the presence of  
46 DPCPX, ZM241385 or DPCPX + ZM241385, GUO still presented a partial cytotoxic effect (Fig. 8c).  
47 However, the co-incubation of the A<sub>1</sub>R antagonist (DPCPX) plus the A<sub>2A</sub>R full agonist (CGS21680) did  
48 not alter glioma cells viability *per se*, and it did not interfere with GUO cytotoxic effect, pointing to a  
49 GUO effect of modulating adenosine A<sub>1</sub> - A<sub>2A</sub> receptors interaction.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Discussion

1  
2  
3  
4 Gliomas are a harmful cancer type that exhibits a typical malignant and resistant phenotype and  
5 currently available therapies present several adverse effects and low responsiveness. Therefore, studies  
6 concerning adjuvant drugs that may improve the chemotherapy effects over gliomas and decrease the  
7 adverse side effects of chemotherapy treatment only are highly desirable [31,32]. Guanosine is an  
8 endogenous non-toxic nucleoside that has been evinced as a neuroprotective agent [11,12]. In this study,  
9 the cytotoxic effect of GUO was compared to the known chemotherapeutic agent TMZ, as well as their  
10 combination, on classical parameters related to gliomas malignancy.

11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18 The antitumoral effect of GUO was already described to Ehrlich carcinoma, in a study where  
19 animals were treated for 10 days with 15mg/kg/day GUO and it caused a 30 % reduction of tumor weight  
20 [33]. The association of GUO with acriflavine treatment *in vivo* demonstrated and enhanced acriflavine  
21 antitumoral effect, by decreasing 96% of tumor weight [33]. In the B16F10 melanoma cell line, GUO  
22 treatment (500, 1000 or 2000  $\mu$ M) diminished cell growth after 48 hours [21]. And, in leukemia and  
23 mastocytoma models, the co-administration of GUO and 5'-deoxy-5-fluorouridine, a chemotherapeutic  
24 compound used in solid tumors treatment, showed an improvement of the chemotherapeutic anti-tumoral  
25 effect [34]. Therefore, GUO and GUO plus chemotherapeutic agents treatment have been already  
26 evaluated. In this study, we are showing that association of GUO with the alkylating agent TMZ  
27 potentiates the apoptotic process in A172 glioma cell line. For the best of our knowledge, it is the first  
28 demonstration of a beneficial effect of GUO in a glioma cell line.

29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40 In A172 glioma cell line, GUO diminished cells viability in concentrations (500 and 1000  $\mu$ M)  
41 that were previously shown not to be toxic to native brain tissue (0.1 – 10 mM) [35]. GUO or TMZ alone  
42 promoted a decrease in A172 cells viability and the drugs combination does not improve this effect.  
43 However, TMZ plus GUO prevented the migration of glioma cells after 24 hours of treatment, indicating  
44 an improvement in the anti-tumor effect with this drugs association. Tumor cells migration capacity is  
45 directly related to the malignancy and the metastasis process. GUO had also been shown to induce  
46 melanoma cells to a less malignant feature through inhibition of proliferation and migration [21].  
47 Recently, a purine analog, sulfinosine has been shown to promote cancer cell death through the induction  
48 of apoptosis by activation of caspase-3 [20]. Acute promyelocytic leukemia exposition to GUO causes  
49 cell death with classical biochemical changes indicative of apoptosis, such as caspase-3 activation and  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 poly-ADP-ribose polymerase (PARP) cleavage, an enzyme involved in DNA repair [36]. However, GUO  
2 treatment in melanoma cells shows that there are no changes in phosphatidylserine exposure related to the  
3 control group [21]. Furthermore, in human hepatoma, GUO treatment does not change features related to  
4 apoptosis, as soluble Fas ligand (a protein of tumor necrosis factor family) content and caspase-3 activity  
5 [37]. Our results also showed no effect on apoptosis activation in glioma cells treated with GUO or TMZ  
6 alone. However, the combination of TMZ and GUO increases apoptosis and promotes dissipation of the  
7  $\Delta\Psi_m$  as observed with the uncoupler agent FCCP. These data suggest that the compounds association  
8 may alter mitochondrial functionality and facilitate apoptosis, what improves the cytotoxic effect [38].  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16 Autophagy is a normal process related to the self-renewal capacity of cells for the removal of  
17 damaged proteins and organelles through the lysosomal action, and apoptosis may be induced by  
18 upstream signaling and this way occurs in combination with autophagy [39,20]. The purine sulfinosine  
19 increases autophagy events in U87 human glioma cells [20]. In this context, TMZ is able to induce  
20 autophagy in glioma cells and the inhibition of the lysosomes acidification, through bafilomycin  
21 treatment, activates apoptosis via caspase-3 activation [40]. In this study, GUO demonstrated no effect on  
22 the AVOs presence, suggesting its cytotoxic effect may not be related to autophagy. TMZ increased  
23 autophagy occurrence significantly as well as the association with GUO.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32 It has been shown that neuroprotective effects of GUO depend on glutamatergic system  
33 modulation, through increasing glutamate uptake or decreasing glutamate release, what may be  
34 responsible for increasing glutamine synthetase (GS) activity [13,41,42,19,14,16]. Despite all of this  
35 evidence, we did not observe GUO effects on glutamate uptake, release, or GS activity, an enzyme that  
36 had been considered as a negative growth regulator in glioma cells [43]. Additionally, the  
37 pharmacological blockade of glutamate receptors or transporters did not interfere with the cytotoxic effect  
38 of GUO. However, TMZ increased glutamate release from glioma cells and the co-incubation with GUO  
39 prevented this increase. It is well described that the high extracellular glutamate levels released by glioma  
40 cells can lead to excitotoxic neuronal death and improve tumor viability, progression, and aggressiveness  
41 [44]. In this sense, the increase in glutamate release could be a possible aggravating factor of TMZ side  
42 effects, if it occurs *in vivo*. In this way, the prevention of glutamate release observed during the combined  
43 treatment with GUO may be a desirable effect to efficient glioma treatment.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

56 It is already described that alterations in glutamate transmission may not explain all the complexity  
57 of gliomas development, thus the purinergic signaling could also interfere with glioma progress [45].  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

AdoR activation has been shown to promote apoptosis in colorectal cancer cells, carcinoma, and osteosarcoma [46]. Several effects of GUO may be dependent on AdoR interaction, mainly A<sub>1</sub>R and A<sub>2A</sub>R (for a review, see) [12] and our group showed that the neuroprotective effect of GUO is abolished by A<sub>1</sub>R antagonist and A<sub>2A</sub>R agonist [14,47], suggesting GUO effects over AdoR may rely on AdoR forming oligomers, a receptorial organization not yet evaluated in glioma cells. Additionally, it was showed that GUO may release adenosine from astrocytes [48]. More recently, it is suggested that GUO increases extracellular adenosine disposition in vascular and endothelial cells cultures [49]. However, this effect was not showed in neural cells and the mechanism is not completely understood, although it seems not to be dependent on nucleosides transporters and adenosine metabolizing enzymes inhibition [49,50]. Thus, it is still not clear whether GUO effects depend on increasing adenosine levels, or may be due to a direct modulation on AdoR. Through extracellular endogenous adenosine removal with ADA, we showed that GUO cytotoxic effect was partially reduced (and not fully, if one expected GUO effect would rely only on adenosine release). Surprisingly, adenosine alone (in a high concentration, probably activating A<sub>2A</sub>R), has no cytotoxic effect, as observed to the A<sub>2A</sub>R full agonist (CGS21680) and also to A<sub>2A</sub>R inverse agonist (ZM241385), which blocks the constitutive activity of A<sub>2A</sub>R in the absence of ligands (basal activity). Thus, it seems GUO effect depends on A<sub>2A</sub>R modulation, although the site of interaction and the exact modulatory effect of GUO at A<sub>2A</sub>R are not known yet. However, it is still puzzling why adenosine has no cytotoxic effect on A172 glioma cells if GUO cytotoxic effect is partially abolished by AdoR ligands. Regarding ADA effect *per se* observed in our study, one might suggest that adenosine deamination, and then inosine formation, would be a mechanism for maintenance of glioma viability. Alternatively, these purine nucleosides may compete to each other for AdoR modulation. This is a possibility that needs further investigation.

When evaluating putative GUO interaction with AdoR, here we showed that the blockade of A<sub>1</sub>R (with DPCPX), or the reduction of the constitutive activity of A<sub>2A</sub>R (with ZM241385), and additionally, the activation of A<sub>2A</sub>R (with CGS21680) interfere with cytotoxic GUO effect. A<sub>1</sub>R and A<sub>2A</sub>R blockade *per se* decreased glioma cells viability, and A<sub>1</sub>R blockade concomitantly with A<sub>2A</sub>R activation did not interfere with GUO effect. Taken together, these data suggest that GUO regulates AdoR interaction, probably by modulating an interaction between A<sub>1</sub>R and A<sub>2A</sub>R, and the downstream signaling over glioma cells viability, with a mechanism that needs further investigation.

1 The activation of AdoR has shown dual effects on cell survival and death cascades. A<sub>1</sub>R activation  
2 inhibits proliferation in human metastatic cell line and A<sub>2A</sub>R activation promotes human melanoma cells  
3 death [51,52]. AdoR activation also has been shown to sensitize glioma cells to chemotherapeutic cytotoxic  
4 effects [53,54]. In this way, it has been already described that AdoR activation is capable of modulating  
5 apoptotic pathways in colorectal cancer, hepatocellular carcinoma, osteosarcoma, and lung cancer, for  
6 example, increasing BAX and BAD levels, promoting alteration in mitochondrial membrane potential and  
7 increasing the efflux of cytochrome C and triggering apoptosis [46]. There is also a well-known TMZ  
8 effect inducing endoplasmic reticulum stress, increasing caspase-3 activation [55]. Taken together, the  
9 AdoR modulation by GUO and TMZ toxicity could lead to an increase in apoptosis levels.  
10

11 In conclusion, we hereby demonstrated the effects of GUO and TMZ causing cytotoxicity in  
12 human A172 glioma cells. The combination of the compounds induces an alteration in mitochondrial  
13 membrane potential and triggers an increase in apoptosis. GUO effects may involve the modulation of  
14 AdoR interaction, although the exact mechanisms of GUO cytotoxic effect on glioma cells must be better  
15 understood, in order to be considered as an adjuvant treatment.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

34 **Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## References

1. Jiang Y, Uhrbom L (2012) On the origin of glioma. *Ups J Med Sci* 117 (2):113-121. doi:10.3109/03009734.2012.658976
2. Ohgaki H, Kleihues P (2009) Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer science* 100 (12):2235-2241. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x
3. Liu C, Sage JC, Miller MR, Verhaak RG, Hippenmeyer S, Vogel H, Foreman O, Bronson RT, Nishiyama A, Luo L, Zong H (2011) Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell* 146 (2):209-221. doi:10.1016/j.cell.2011.06.014
4. Desjardins A, Rich JN, Quinn JA, Vredenburgh J, Gururangan S, Sathornsumetee S, Reardon DA, Friedman AH, Bigner DD, Friedman HS (2005) Chemotherapy and novel therapeutic approaches in malignant glioma. *Front Biosci* 10:2645-2668
5. Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C (1997) Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 23 (1):35-61
6. Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G (2013) Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 61 (1):25-41. doi:10.1007/s00005-012-0203-0
7. Holland EC (2000) Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (12):6242-6244
8. de Groot J, Sontheimer H (2011) Glutamate and the biology of gliomas. *Glia* 59 (8):1181-1189. doi:10.1002/glia.21113
9. Ye ZC, Rothstein JD, 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 (24):10767-10777
10. Ribeiro MP, Custodio JB, Santos AE (2016) Ionotropic glutamate receptor antagonists and cancer therapy: time to think out of the box? *Cancer chemotherapy and pharmacology*. doi:10.1007/s00280-016-3129-0
11. Schmidt AP, Lara DR, Souza DO (2007) Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 116 (3):401-416. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.07.004
12. Lanznaster D, Dal-Cim T, Piermartiri TC, Tasca CI (2016) Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. *Aging and disease* 7 (5):657-679. doi:10.14336/AD.2016.0208
13. Molz S, Dal-Cim T, Budni J, Martín-de-Saavedra MD, Egea J, Romero A, del Barrio L, Rodrigues AL, López MG, Tasca CI (2011) Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. *J Neurosci Res* 89 (9):1400-1408. doi:10.1002/jnr.22681
14. Dal-Cim T, Ludka FK, Martins WC, Reginato C, Parada E, Egea J, Lopez MG, Tasca CI (2013) Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. *Journal of neurochemistry* 126 (4):437-450. doi:10.1111/jnc.12324
15. Dal-Cim T, Martins WC, Santos AR, Tasca CI (2011) Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca(2)+-activated K+ channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. *Neuroscience* 183:212-220. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.022
16. Dal-Cim T, Martins WC, Thomaz DT, Coelho V, Poluceno GG, Lanznaster D, Vandresen-Filho S, Tasca CI (2016) Neuroprotection Promoted by Guanosine Depends on Glutamine Synthetase and Glutamate Transporters Activity in Hippocampal Slices Subjected to Oxygen/Glucose Deprivation. *Neurotoxicity research* 29 (4):460-468. doi:10.1007/s12640-015-9595-z

17. Thomaz DT, Dal-Cim TA, Martins WC, Cunha MP, Lanznaster D, de Bem AF, Tasca CI (2016) Guanosine prevents nitroxidative stress and recovers mitochondrial membrane potential disruption in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. *Purinergic signalling* 12 (4):707-718. doi:10.1007/s11302-016-9534-3
18. Dal-Cim T, Martins WC, Santos AR, Tasca CI (2011) Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. *Neuroscience* 183:212-220. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.022
19. Dal-Cim T, Ludka FK, Martins WC, Reginato C, Parada E, Egea J, López MG, Tasca CI (2013) Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. *J Neurochem* 126 (4):437-450. doi:10.1111/jnc.12324
20. Dačević M, Isaković A, Podolski-Renić A, Isaković AM, Stanković T, Milošević Z, Rakić L, Ruždijić S, Pešić M (2013) Purine nucleoside analog--sulfinosine modulates diverse mechanisms of cancer progression in multi-drug resistant cancer cell lines. *PLoS One* 8 (1):e54044. doi:10.1371/journal.pone.0054044
21. Naliwaiko K, Luvizon AC, Donatti L, Chammas R, Mercadante AF, Zanata SM, Nakao LS (2008) Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway. *Chem Biol Interact* 173 (2):122-128. doi:10.1016/j.cbi.2008.03.010
22. de Saldanha da Gama Fischer J, Costa Carvalho P, da Fonseca CO, Liao L, Degraive WM, da Gloria da Costa Carvalho M, Yates JR, Domont GB (2011) Chemo-resistant protein expression pattern of glioblastoma cells (A172) to perillyl alcohol. *J Proteome Res* 10 (1):153-160. doi:10.1021/pr100677g
23. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65 (1-2):55-63
24. Stepanenko AA, Dmitrenko VV (2015) Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* 574 (2):193-203. doi:10.1016/j.gene.2015.08.009
25. Yelskaya Z, Carrillo V, Dubisz E, Gulzar H, Morgan D, Mahajan SS (2013) Synergistic inhibition of survival, proliferation, and migration of U87 cells with a combination of LY341495 and Iressa. *PLoS One* 8 (5):e64588. doi:10.1371/journal.pone.0064588
26. Egea J, Rosa AO, Cuadrado A, García AG, López MG (2007) Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. *J Neurochem* 102 (6):1842-1852. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04665.x
27. Shapiro BM (1970) Regulation of glutamine synthetase by enzyme catalyzed structural modification. *Angew Chem Int Ed Engl* 9 (9):670-678. doi:10.1002/anie.197006701
28. Vandresen-Filho S, Martins WC, Bertoldo DB, Mancini G, Herculano BA, de Bem AF, Tasca CI (2013) Atorvastatin prevents cell damage via modulation of oxidative stress, glutamate uptake and glutamine synthetase activity in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. *Neurochemistry international* 62 (7):948-955. doi:10.1016/j.neuint.2013.03.002
29. Molz S, Decker H, Oliveira IJ, Souza DO, Tasca CI (2005) Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem Res* 30 (1):83-89
30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193 (1):265-275
31. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109 (1):93-108. doi:10.1007/s00401-005-0991-y
32. Westphal M, Lamszus K (2011) The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* 12 (9):495-508. doi:10.1038/nrn3060
33. Kim SG, Kim CW, Ahn ET, Lee KY, Hong EK, Yoo BI, Han YB (1997) Enhanced anti-tumour effects of acriflavine in combination with guanosine in mice. *J Pharm Pharmacol* 49 (2):216-222



- 1 34. Iigo M, Miwa M, Ishitsuka H, Nitta K (1987) Potentiation of the chemotherapeutic action of  
2 5'-deoxy-5-fluorouridine in combination with guanosine and related compounds. *Cancer*  
3 *Chemother Pharmacol* 19 (1):61-64
- 4 35. Molz S, Dal-Cim T, Tasca CI (2009) Guanosine-5'-monophosphate induces cell death in rat  
5 hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake  
6 inhibition. *Neurochem Int* 55 (7):703-709. doi:10.1016/j.neuint.2009.06.015
- 7 36. Flanagan SA, Gandhi V, Meckling KA (2007) Guanosine acts intracellularly to initiate  
8 apoptosis in NB4 cells: A role for nucleoside transport. *Leuk Lymphoma* 48 (9):1816-1827.  
9 doi:10.1080/10428190701528491
- 10 37. Yang SC, Chiu CL, Huang CC, Chen JR (2005) Apoptosis induced by nucleosides in the human  
11 hepatoma HepG2. *World J Gastroenterol* 11 (40):6381-6384
- 12 38. Ly JD, Grubb DR, Lawen A (2003) The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in  
13 apoptosis; an update. *Apoptosis* 8 (2):115-128
- 14 39. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk  
15 between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (9):741-752. doi:10.1038/nrm2239
- 16 40. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S (2004) Role of autophagy in  
17 temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 11 (4):448-  
18 457. doi:10.1038/sj.cdd.4401359
- 19 41. Moretto MB, Arteni NS, Lavinsky D, Netto CA, Rocha JB, Souza DO, Wofchuk S (2005)  
20 Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats:  
21 prevention by guanosine. *Experimental neurology* 195 (2):400-406.  
22 doi:10.1016/j.expneurol.2005.06.005
- 23 42. Thomazi AP, Boff B, Pires TD, Godinho G, Battú CE, Gottfried C, Souza DO, Salbego C,  
24 Wofchuk ST (2008) Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices  
25 exposed to oxygen and glucose deprivation: developmental aspects and protection by  
26 guanosine. *Brain Res* 1188:233-240. doi:10.1016/j.brainres.2007.10.037
- 27 43. Yin Y, Sun W, Xiang J, Deng L, Zhang B, Xie P, Qiao W, Zou J, Liu C (2013) Glutamine  
28 synthetase functions as a negative growth regulator in glioma. *J Neurooncol* 114 (1):59-69.  
29 doi:10.1007/s11060-013-1168-5
- 30 44. Robert SM, Sontheimer H (2014) Glutamate transporters in the biology of malignant  
31 gliomas. *Cell Mol Life Sci* 71 (10):1839-1854. doi:10.1007/s00018-013-1521-z
- 32 45. Braganhol E, Wink MR, Lenz G, Battastini AM (2013) Purinergic signaling in glioma  
33 progression. *Adv Exp Med Biol* 986:81-102. doi:10.1007/978-94-007-4719-7\_5
- 34 46. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G (2013) Immunity, inflammation and cancer: a  
35 leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer* 13 (12):842-857. doi:10.1038/nrc3613
- 36 47. Ciruela F (2013) Guanosine behind the scene. *Journal of neurochemistry* 126 (4):425-427.  
37 doi:10.1111/jnc.12328
- 38 48. Ciccarelli R, Di Iorio P, Giuliani P, D'Alimonte I, Ballerini P, Caciagli F, Rathbone MP (1999)  
39 Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after  
40 hypoxia/hypoglycemia. *Glia* 25 (1):93-98
- 41 49. Jackson EK, Gillespie DG (2013) Regulation of Cell Proliferation by the Guanosine-  
42 Adenosine Mechanism: Role of Adenosine Receptors. *Physiol Rep* 1 (2):e00024.  
43 doi:10.1002/phy2.24
- 44 50. Jackson EK, Cheng D, Jackson TC, Verrier JD, Gillespie DG (2013) Extracellular guanosine  
45 regulates extracellular adenosine levels. *Am J Physiol Cell Physiol* 304 (5):C406-421.  
46 doi:10.1152/ajpcell.00212.2012
- 47 51. Ceruti S, Abbracchio MP (2013) Adenosine signaling in glioma cells. *Adv Exp Med Biol*  
48 986:13-30. doi:10.1007/978-94-007-4719-7\_2
- 49 52. Merighi S, Mirandola P, Varani K, Gessi S, Leung E, Baraldi PG, Tabrizi MA, Borea PA (2003)  
50 A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther* 100  
51 (1):31-48

- 1 53. Daniele S, Zappelli E, Natali L, Martini C, Trincavelli ML (2014) Modulation of A1 and A2B  
2 adenosine receptor activity: a new strategy to sensitise glioblastoma stem cells to  
3 chemotherapy. *Cell Death Dis* 5:e1539. doi:10.1038/cddis.2014.487
- 4 54. D'Alimonte I, Nargi E, Zuccarini M, Lanuti P, Di Iorio P, Giuliani P, Ricci-Vitiani L, Pallini R,  
5 Caciagli F, Ciccarelli R (2015) Potentiation of temozolomide antitumor effect by purine  
6 receptor ligands able to restrain the in vitro growth of human glioblastoma stem cells.  
7 *Purinergic Signal* 11 (3):331-346. doi:10.1007/s11302-015-9454-7
- 8 55. Germano IM, Emdad L, Qadeer ZA, Binello E, Uzzaman M (2010) Embryonic stem cell (ESC)-  
9 mediated transgene delivery induces growth suppression, apoptosis and radiosensitization,  
10 and overcomes temozolomide resistance in malignant gliomas. *Cancer Gene Ther* 17 (9):664-  
11 674. doi:10.1038/cgt.2010.31
- 12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Captions

**Fig. 1** GUO time-course and concentration-response curves on A172 glioma cells. **a.** GUO time-course (24, 48 and 72 hours, hs) and concentration curve (50, 100, 500 and 1000  $\mu\text{M}$ ) was performed in A172 glioma cells to assess cellular viability during A172 glioma cell growing curve. **b.** A172 cells were treated with GUO (50 to 1000  $\mu\text{M}$ ) for 48 hours and the viability was assessed. Data expressed as optical density (O.D.) at 540 nm in **a**, and as a percentage related to the control group (dotted line) in **b**.  $n = 6$  of independent experiments for **a** and **b** separately.  $*p < 0.05$  compared to the control group

**Fig. 2** GUO and TMZ effects on A172 glioma cells viability. **a.** A172 glioma cells viability assessed by MTT reduction assay after 48 hours of GUO (500  $\mu\text{M}$ ), TMZ (500  $\mu\text{M}$ ) or drugs combination treatment. **b.** Cells viability assessed through direct cell counting using Trypan exclusion assay. A172 glioma cells were treated with GUO (500  $\mu\text{M}$ ), TMZ (500  $\mu\text{M}$ ) of both for 48 hours. Values expressed as viable cells, being control group around 90% of viable cells. **c.** A172 cells viability assessed by an ATP-based assay in cells treated with GUO (500  $\mu\text{M}$ ), TMZ (500  $\mu\text{M}$ ) or both treatments for 48 hours. Data expressed as a percentage related to the control group, that was considered as 100% (a, b and c) and expressed as a dotted line.  $n = 5$  of independent experiments for **a**;  $n = 3$  of independent experiments for **b** and **c**.  $*p < 0.05$  compared to the control group,  $\#p < 0.05$  compared to the GUO group and  $\$p < 0,05$  compared to the TMZ group in **a**, **b** and **c**

**Fig. 3** GUO and TMZ effects on A172 glioma cells migration. After confluence, cells were treated (GUO – 500  $\mu\text{M}$ ; TMZ – 500  $\mu\text{M}$ ; GUO 500  $\mu\text{M}$  + TMZ 500  $\mu\text{M}$ ), the scratch assay was performed and the cells photographed subsequently and after 24 and 48 hours. **a.** Illustrative images from cells subjected to the scratched protocol and evaluated after 0, 24, and 48h, scale bar – 200  $\mu\text{m}$ . **b.** Gap width was quantified as arbitrary units of pixels number on Image J Software.  $n = 3$  of independent experiments.  $*p < 0.05$  compared to the same time control group

**Fig. 4** GUO and TMZ effects on autophagy in A172 glioma cells. After confluence, A172 cells were treated (GUO – 500  $\mu\text{M}$ ; TMZ – 500  $\mu\text{M}$ ; GUO 500  $\mu\text{M}$  + TMZ 500  $\mu\text{M}$ ). After 48 hours of treatment, the cells were washed and stained with Acridine Orange and photographed. **a.** Representative images of acridine orange staining in AVOs, scale bar – 80  $\mu\text{m}$ . **b.** Dot plot of AVOs presence counting in a flow

cytometer. **c.** Quantification of AVOs presence counting in a flow cytometer. A.O. – Acridine Orange; AVOs – Acidic Vesicular Organelles. n = 5 independent experiments. \*p<0.05 compared to the control group

**Fig. 5** GUO and/or TMZ effects on apoptosis levels in A172 glioma cells. After confluence, A172 cells were treated with GUO 500  $\mu$ M, TMZ 500  $\mu$ M or with the drugs combination. After 48 hours cells were detached, washed and stained with Annexin V and/or propidium iodide and counted in a flow cytometer.

**a.** Illustrative dot plots of flow cytometry. **b.** Quantification of flow cytometer cells sorted. **c.** Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was assessed and quantified. PI – Propidium Iodide. n = 5 of independent experiments for **b** and **c**. \*p<0.05 compared to the control group

**Fig. 6** Effects of treatment with GUO and/or TMZ on glutamate transport and glutamine synthetase (GS) activity in A172 glioma cells. After confluence, A172 glioma cells were treated with GUO 500  $\mu$ M, TMZ 500  $\mu$ M or both during 48 hours and then was evaluated the levels of **a.** glutamate uptake into A172 cells, and **b.** glutamate release from A172 cells. The glutamate content was normalized to viable cells number. **c.** After GUO and/or TMZ treatment (48 hours), the A172 cells were detached from the culture bottles, washed and the GS activity was measured. n = 5 of independent experiments for **a**, **b** and **c** separately. \*p<0.05 compared to the control group and #p<0.05 compared to TMZ group

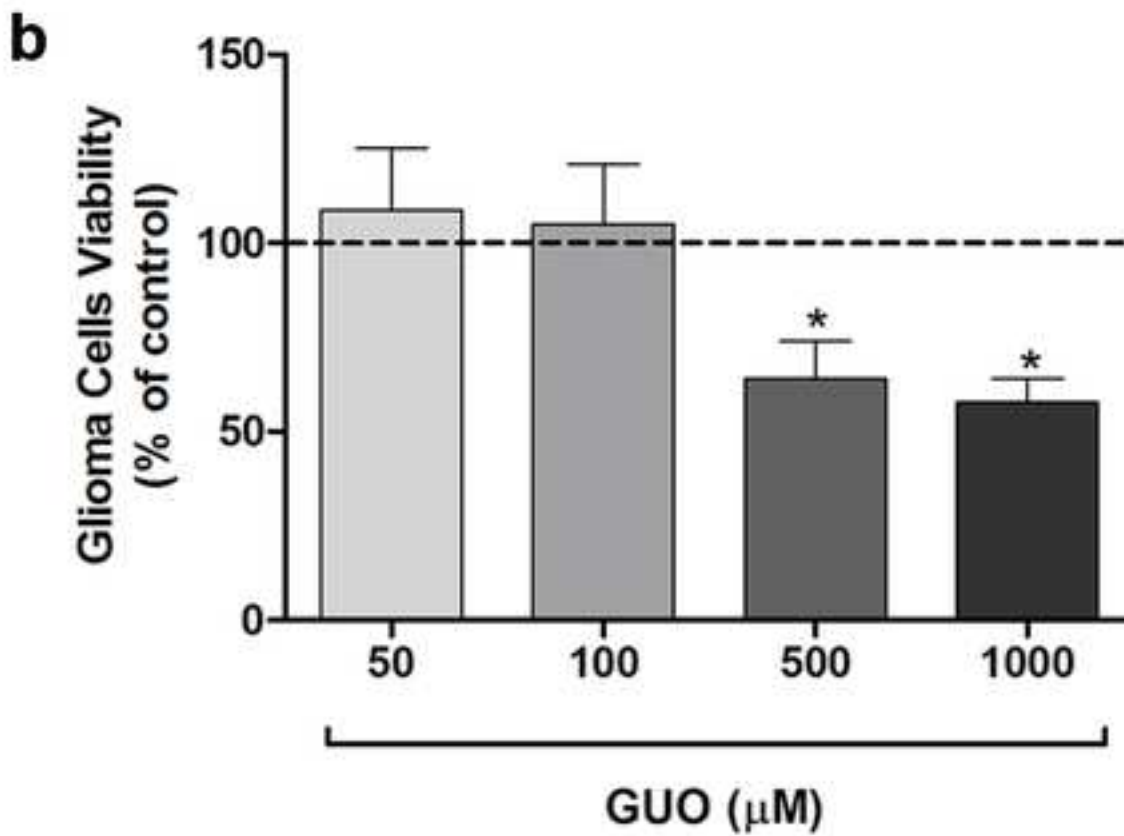
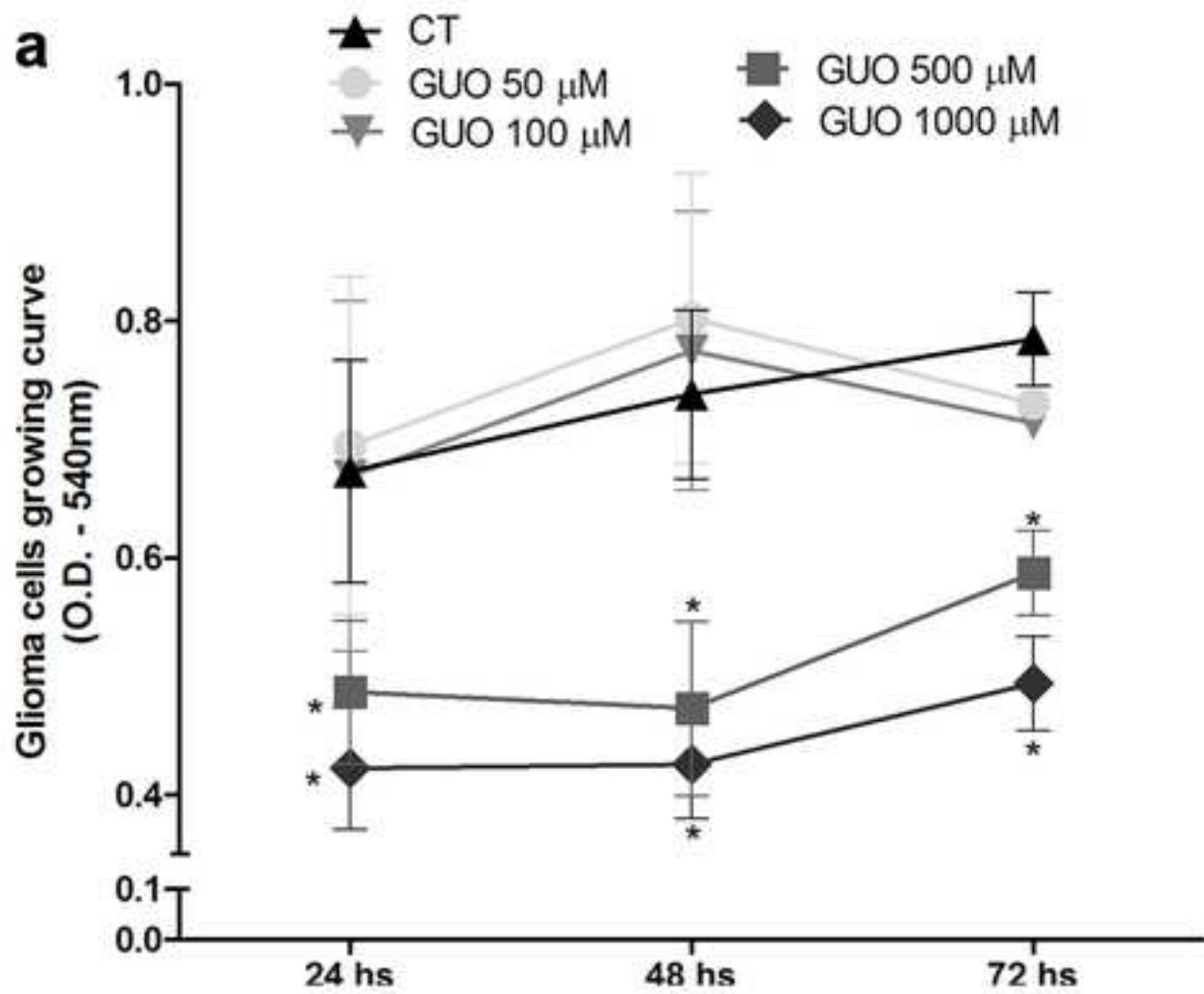
**Fig. 7** Evaluation of glutamate transporters and receptors involvement on GUO induced cytotoxic effect in A172 glioma cells. After confluence, A172 glioma cells were pre-treated with glutamate transporters inhibitors or glutamate receptor antagonists then incubated with GUO for 48 hours and cell viability was assayed via MTT reduction method. **a.** SAS (300  $\mu$ M) or DL-TBOA (100  $\mu$ M) were used to analyze glutamate transporters or  $X_c^-$  system involvement on GUO cytotoxic effect. **b.** MK801 (1  $\mu$ M) or DNQX (1  $\mu$ M) were used to analyze NMDA or AMPA receptors participation on GUO cytotoxic effect. **c.** GAMS (1  $\mu$ M) or MCPG (10  $\mu$ M) were used to analyze Kainate or metabotropic glutamate receptors interaction on GUO cytotoxic effect. Data expressed as a percentage related to the control group that was considered as 100% and expressed as a dotted line. n=6 of independent experiments for **a**, **b** and **c** separately. \*p<0.05 compared to the control group

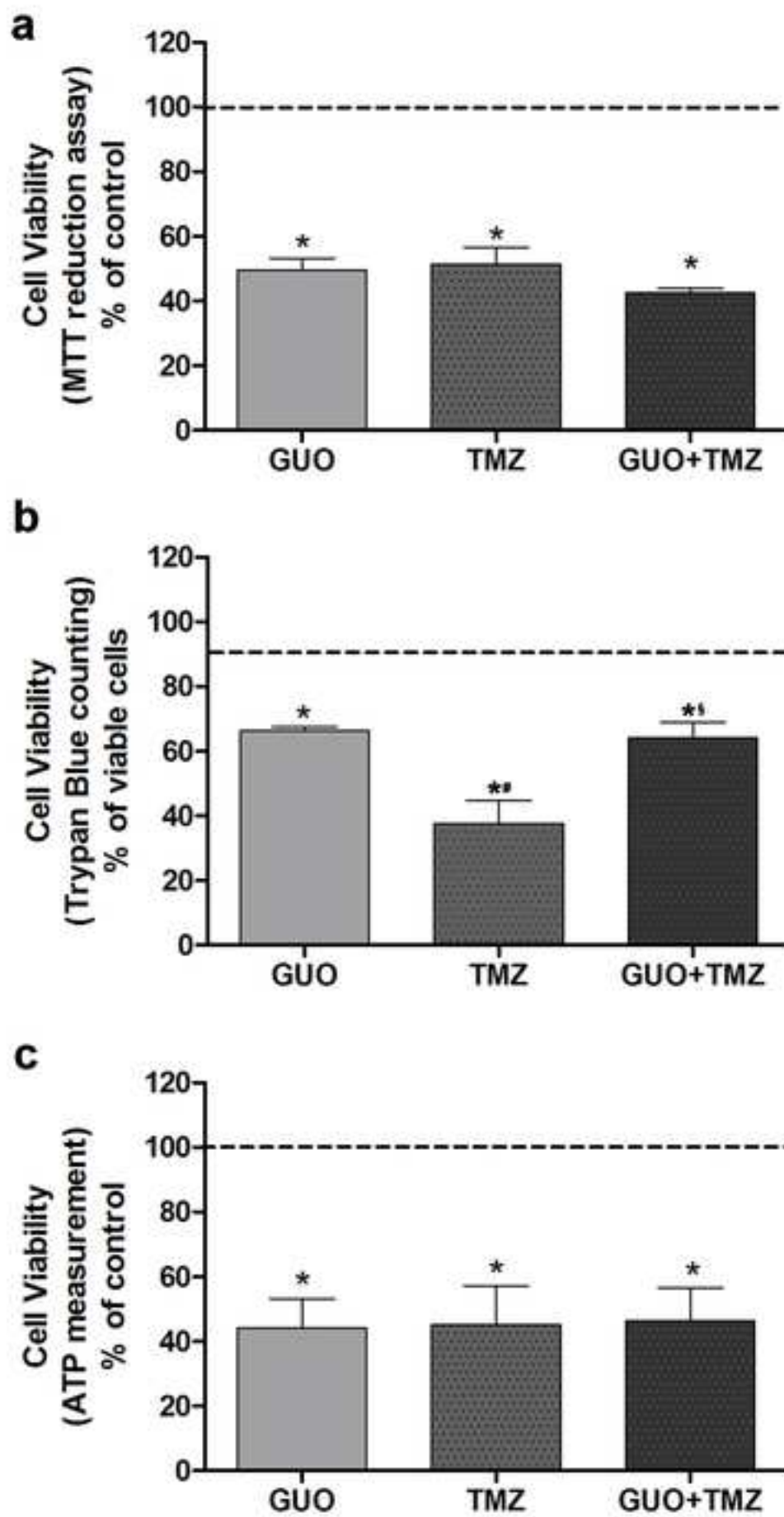
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

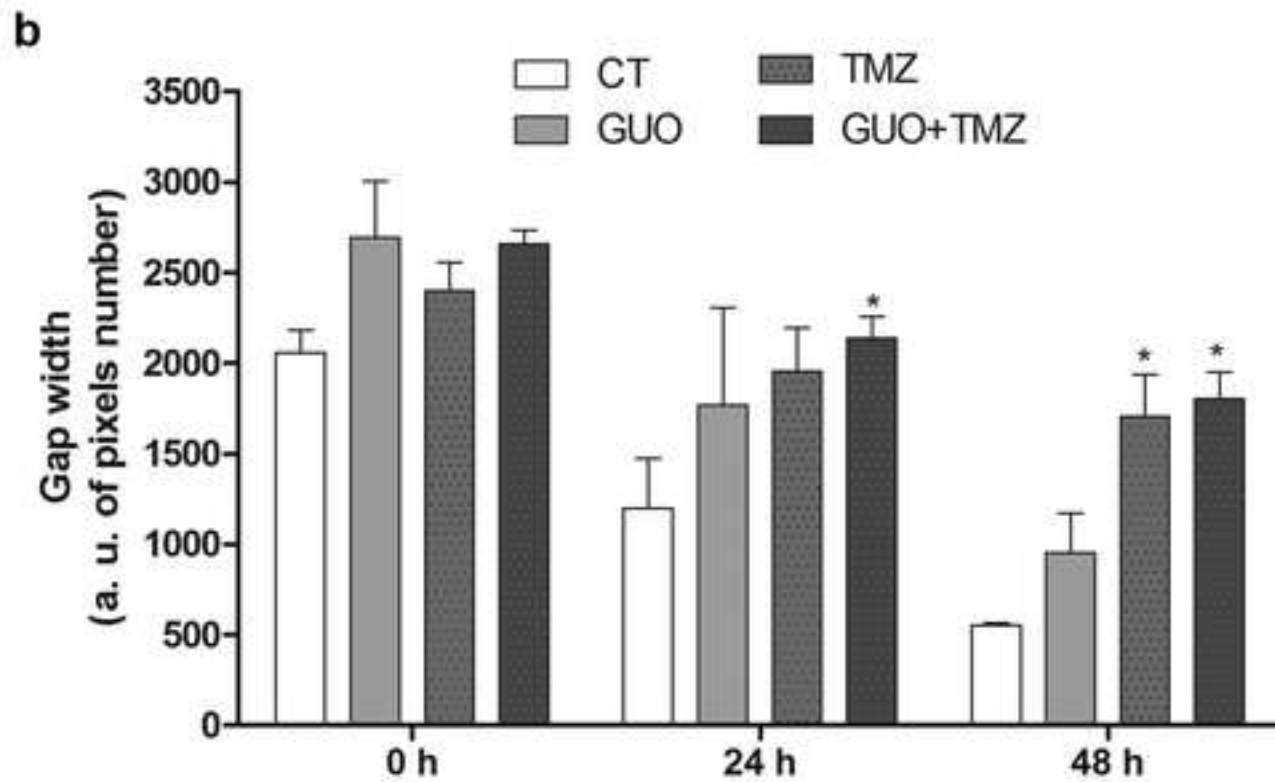
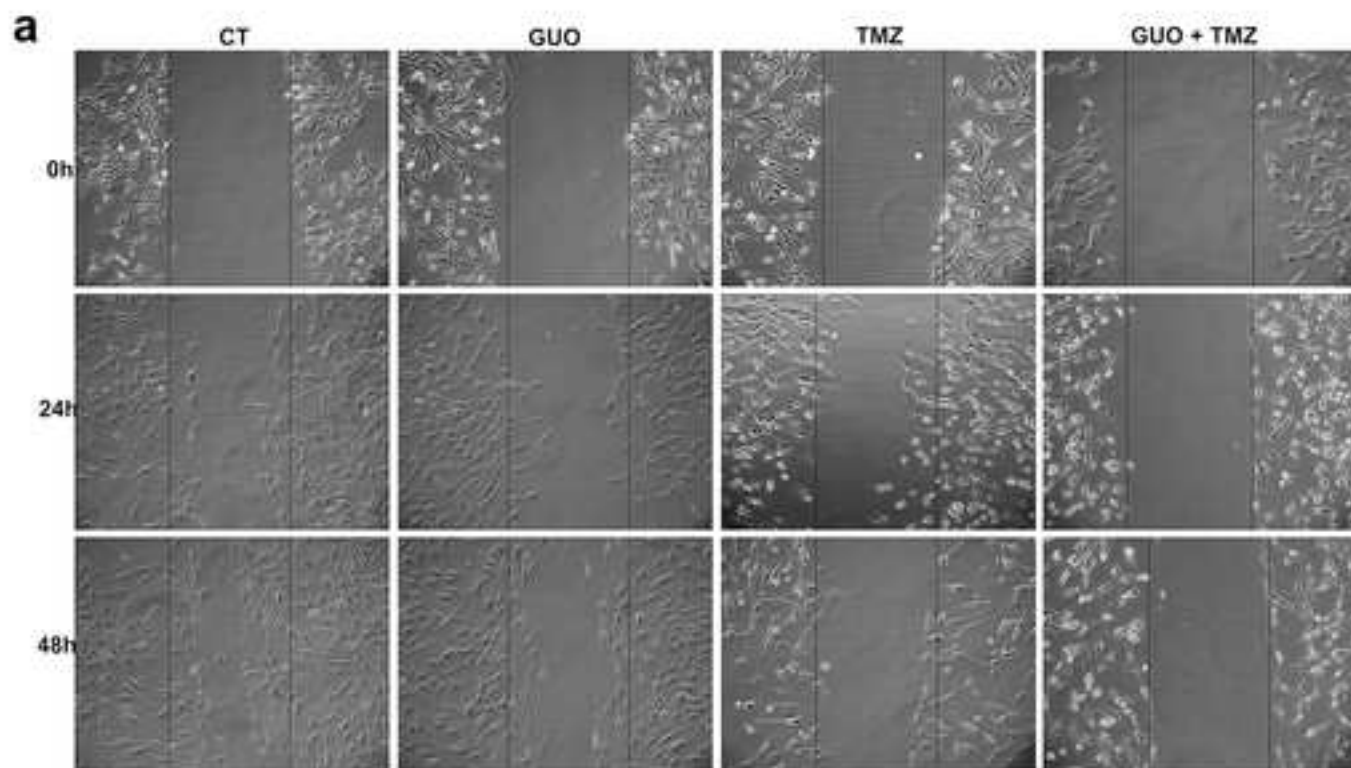
**Fig. 8** GUO exerts cytotoxicity on A172 glioma cells via adenosine receptors interaction. After confluence, A172 glioma cells were pre-treated with transporters inhibitors or receptors ligands and then incubated with GUO for 48 hours and cell viability was assayed via MTT reduction method. **a.** DIPY (10  $\mu$ M) was used to analyze nucleoside transport involvement on GUO effect. ADA (0.5 U/mL) was used to metabolize endogenous adenosine. **b.** Adenosine (500  $\mu$ M) – AdoR full agonist, CGS 21680 (30  $\eta$ M) - A<sub>2A</sub>R full agonist and ZM241385 (50  $\eta$ M) - A<sub>2A</sub>R inverse agonist were used to evaluate AdoR and A<sub>2A</sub>R participation on GUO cytotoxic effect. **c.** DPCPX (100  $\eta$ M) was used to evaluate A<sub>1</sub>R participation on GUO effect. DPCPX (100  $\eta$ M) + ZM241385 (50  $\eta$ M) were co-incubated to study A<sub>1</sub>R - A<sub>2A</sub>R interaction in GUO cytotoxic effect. **d.** DPCPX (100  $\eta$ M) + CGS 21680 (30  $\eta$ M) were co-incubated to study A<sub>1</sub>R inactivation and A<sub>2A</sub>R activation, and receptors interaction in GUO cytotoxic effect. Data expressed as a percentage related to the control group that was considered as 100% and expressed as a dotted line. n=6 of independent experiments for **a**, **b**, **c**, and **d** separately. \*p<0.05 compared to the control group and #p<0.05 compared to GUO group

**Fig. 9** Schematic overview of GUO and GUO plus TMZ association effects on A172 glioma cells. GUO shows cytotoxic effect to glioma cells via adenosine receptors (A<sub>1</sub>R and A<sub>2A</sub>R) interaction, but its cytotoxic effect does not depend on glutamate receptors (GluR) or glutamate (excitatory amino acids) transporters (EAAT) interaction. GUO plus TMZ treatment promoted a decreased mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and increased apoptosis. TMZ induces an increase in glutamate release, an effect that is prevented by co-treatment with GUO. Additional mechanisms of GUO plus TMZ cytotoxic effects on glioma cells remain to be identified. This figure was produced using Servier Medical Art (<http://www.servier.com>)

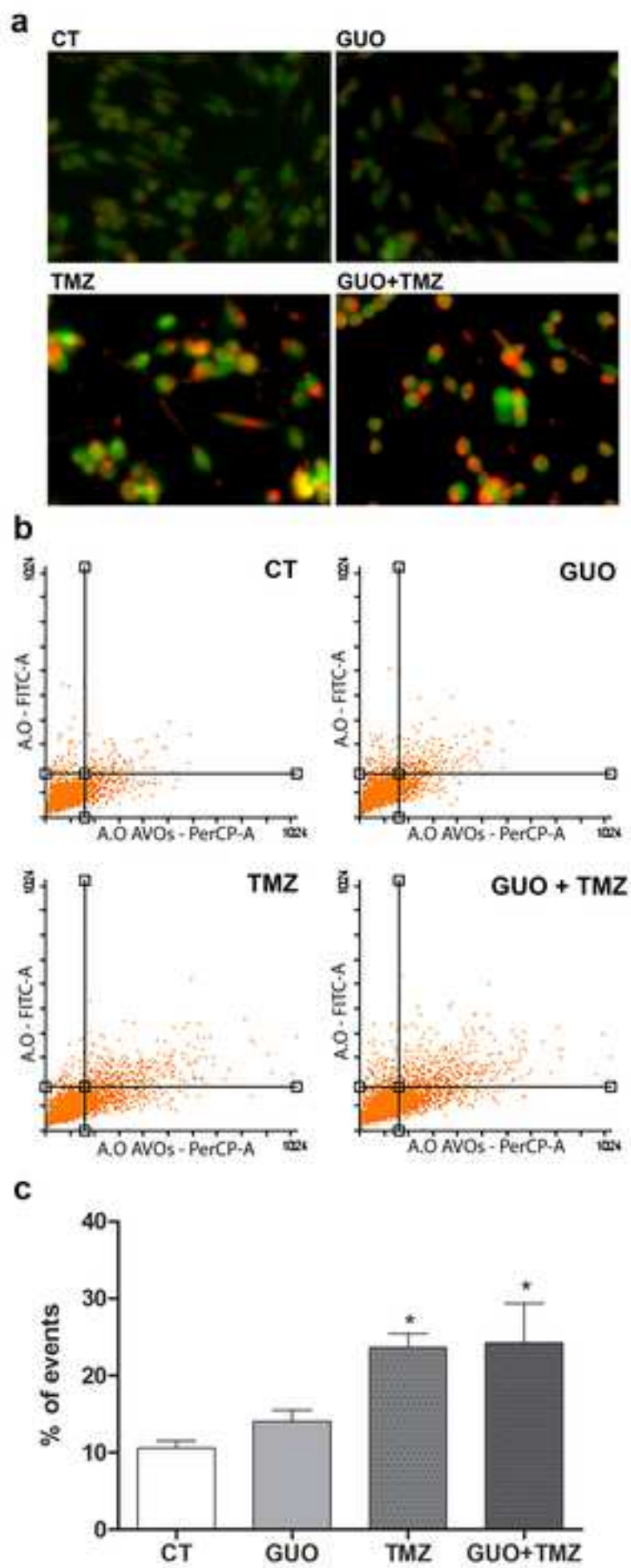
110



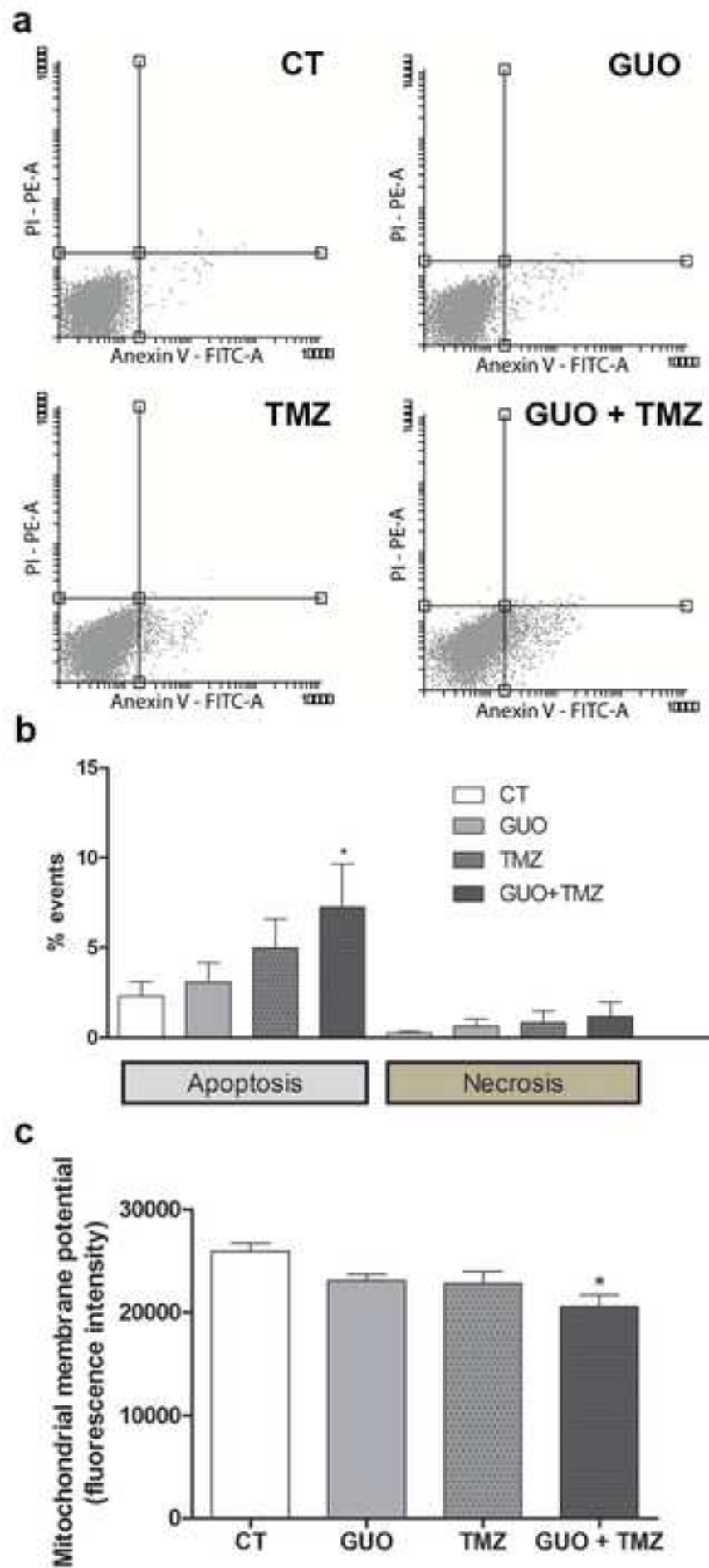


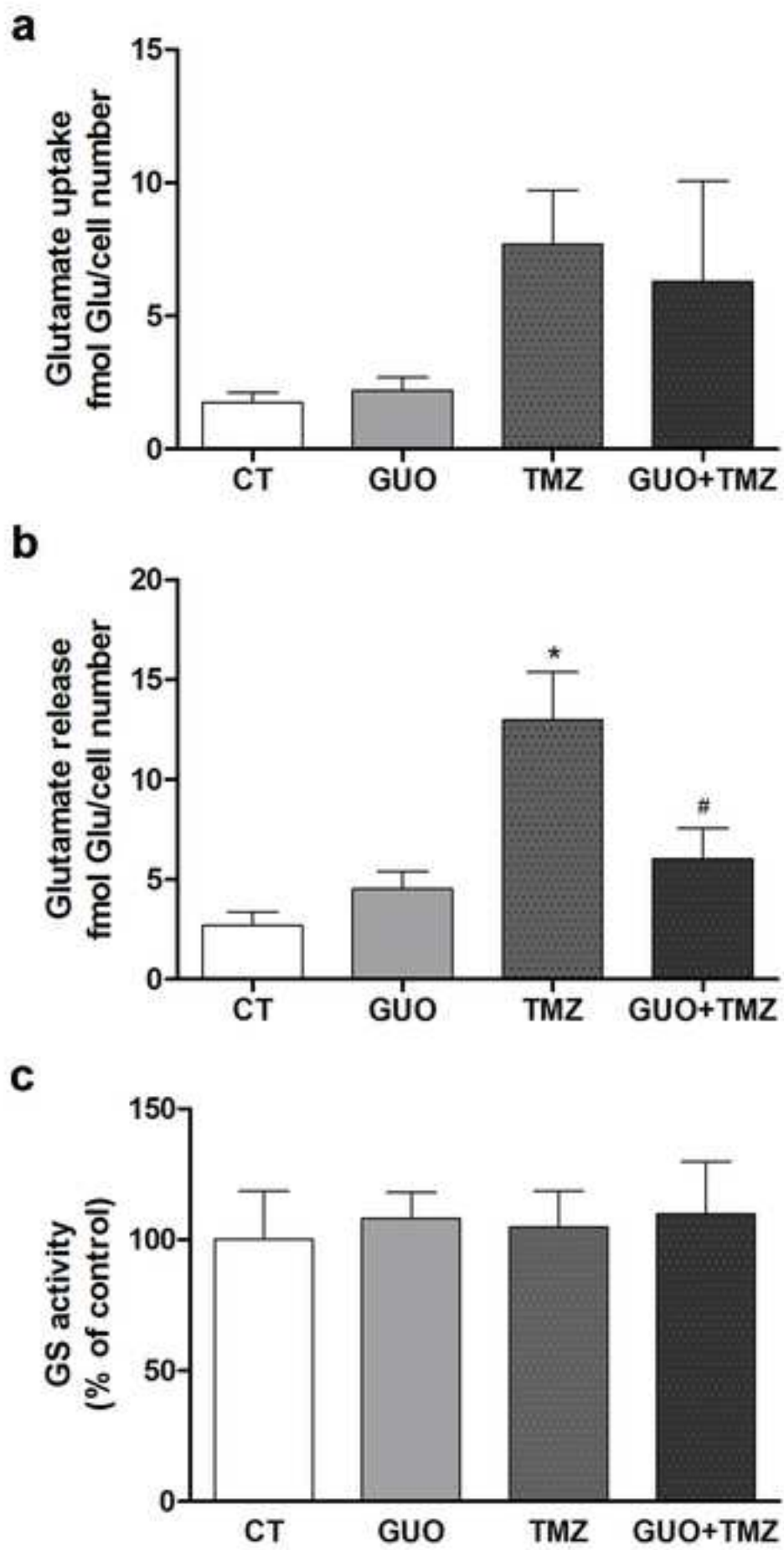


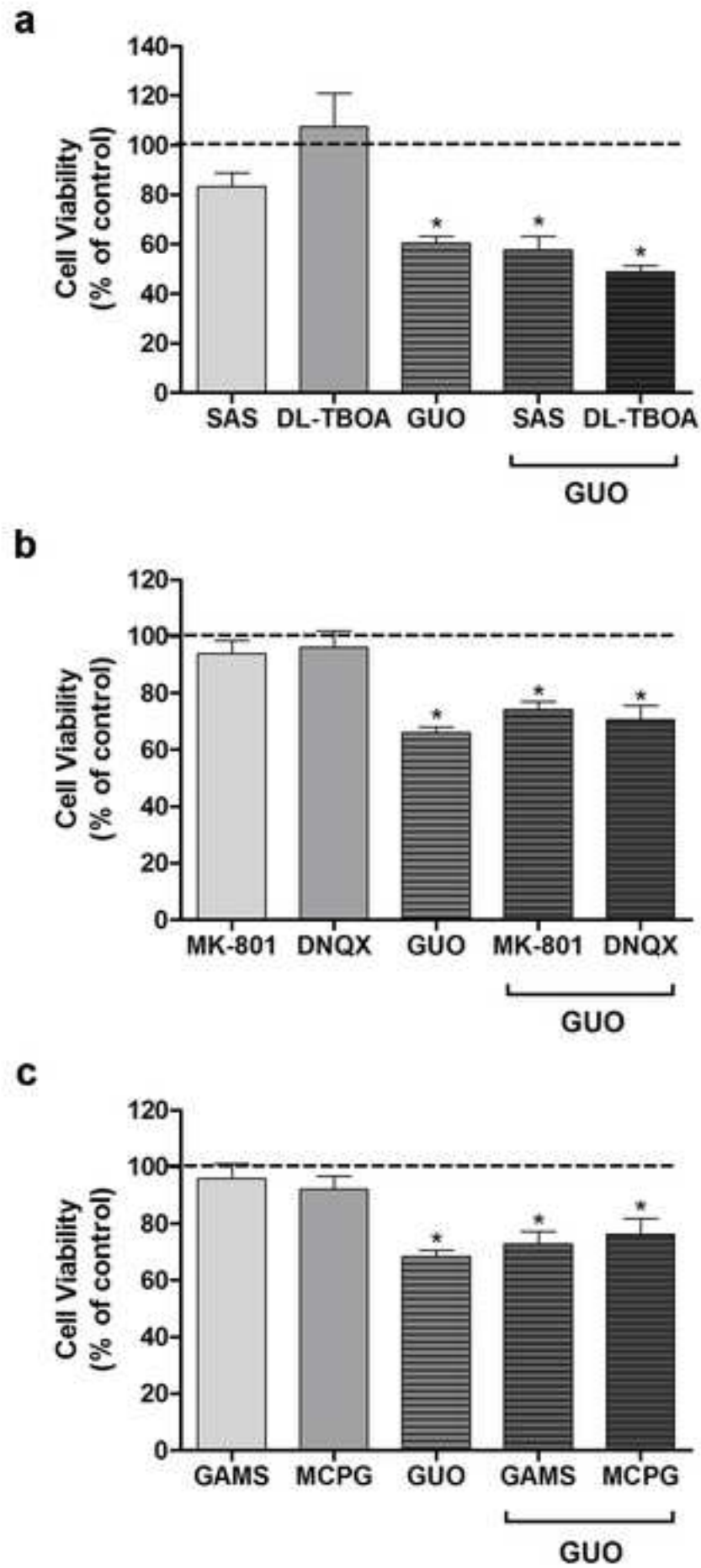


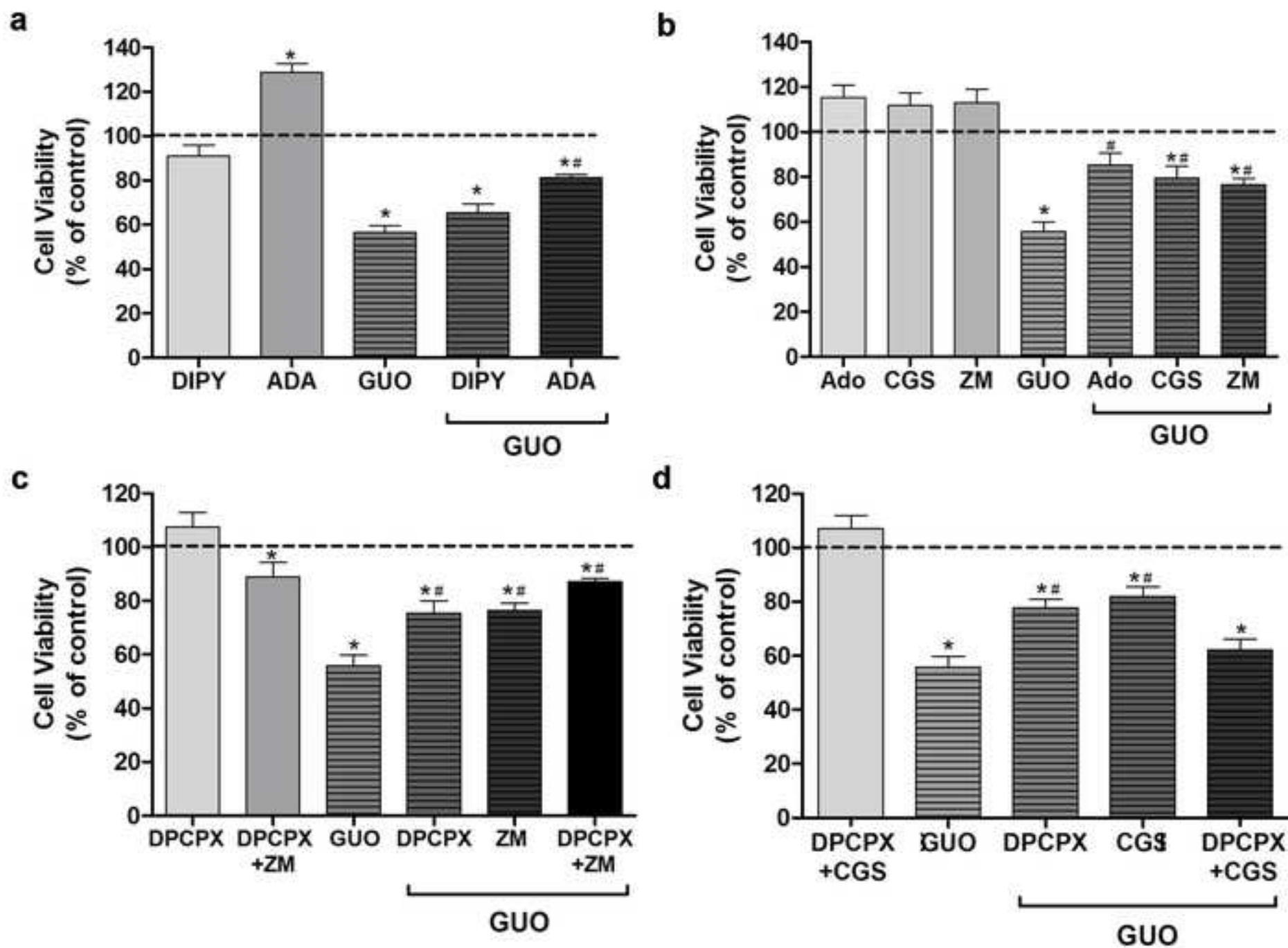


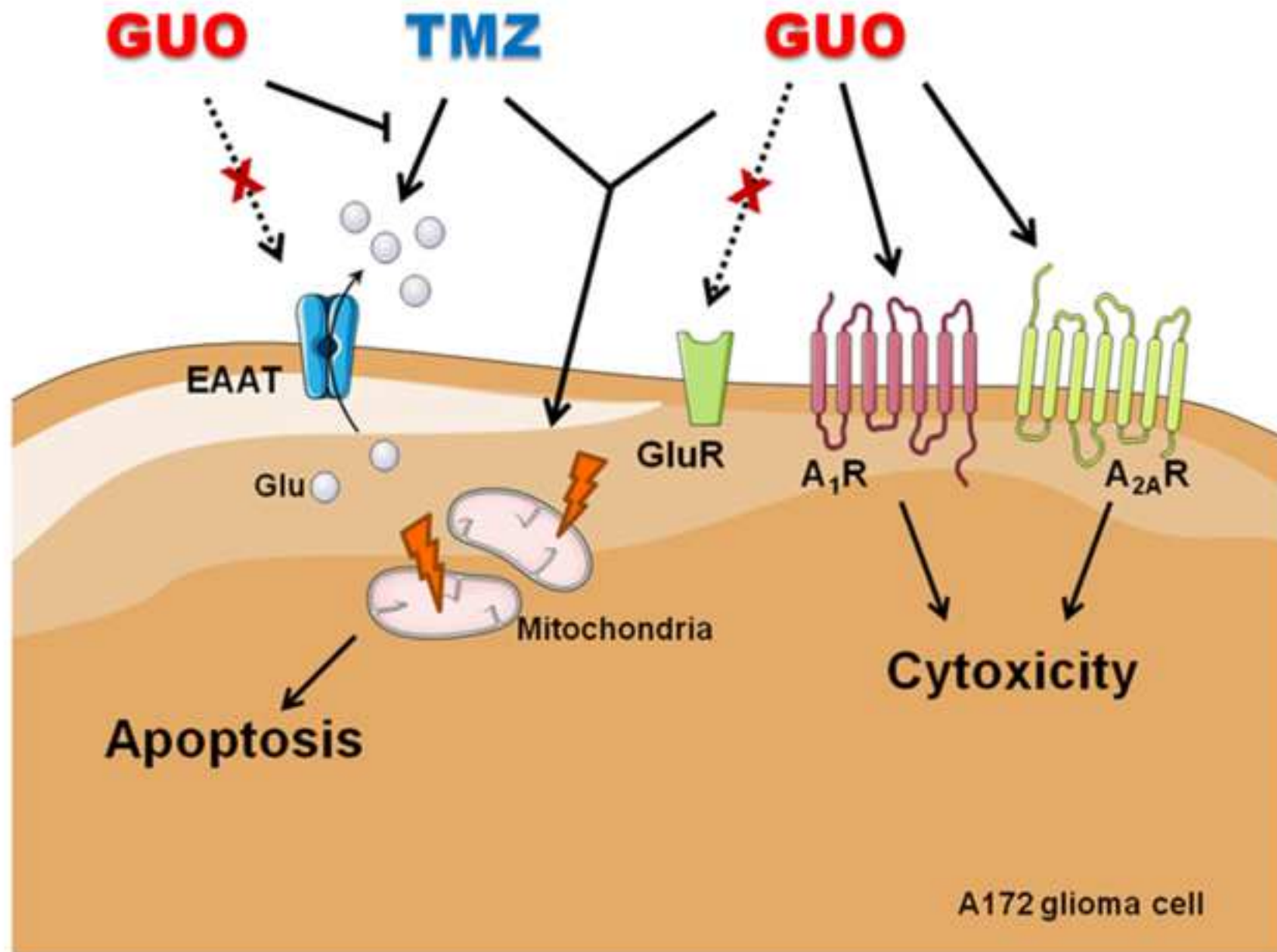
114











ANEXO B – CAPÍTULO II





**GUANOSINE DECREASES MIGRATION AND  
PROLIFERATION AND INDUCES DNA DAMAGE IN  
TEMOZOLOMIDE-TREATED A172 GLIOMA CELLS**

Karen A.Oliveira<sup>1</sup>; Flávia G. Lopes<sup>3</sup>; Flora T. Maraslis<sup>5</sup>; Sharbel W.  
Maluf<sup>5,6</sup>; Cláudia B. Nedel<sup>3,4</sup>; Carla I. Tasca<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento; <sup>4</sup>Departamento de Biologia Celular, <sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmácia; <sup>6</sup>Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago; Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

**Running Title:** Guanosine reduces migration and proliferation in A172 glioma

**Corresponding author:**

Carla Inês Tasca

Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC

Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil

**Telephone number:** +55-48 3721-5046

E-mail address: carla.tasca@ufsc.br

**Acknowledgements**

This study was supported by grants from the Brazilian funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) - (Universal/2012; INCT), FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) - (NENASC/PRONEX) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) - (PVE-052/2012) to C.I.T., and CNPq (Universal/2013) to C.B.N. T.D.-C. was recipient of a CAPES/PVE post-doctoral fellowship and C.I.T. is recipient of CNPq productivity fellowship.



## 6. DISCUSSÃO

Os gliomas compreendem 70 a 80% dos tumores cerebrais malignos, dependendo da localização e mesmo com todos os estudos acerca de tratamentos para o câncer, pacientes acometidos por gliomas têm uma sobrevida entre 12 a 15 meses após o diagnóstico (Ostrom *et al.*, 2014). O tratamento após diagnóstico ocorre, principalmente, com cirurgia de ressecção, radioterapia e quimioterapia. Atualmente, a TMZ está entre os medicamentos mais utilizados no tratamento de gliomas. A escolha do quimioterápico e a possível associação com a radioterapia é dependente do grau de malignidade, sendo que a TMZ aliada à radioterapia é aplicada nos casos de maior malignidade (Stupp *et al.*, 2014). Mesmo que a associação de radioterapia e do quimioterápico TMZ resulte em melhora do quadro, esta ainda não é satisfatória, já que o aumento da sobrevida do paciente vai de 12,1 meses - somente com TMZ - para 14,6 meses – com TMZ aliada à radioterapia. Nesse aspecto, estudos sobre os mecanismos celulares e sobre o efeito de compostos potencialmente adjuvantes é de grande interesse para a compreensão e melhor tratamento da doença.

As estatinas têm demonstrado diversos efeitos benéficos dentre seus efeitos pleiotrópicos. Estudos relatam a ação de estatinas em células de glioma humanos. A lovastatina inibe a proliferação de células de linhagens de glioma humano, de maneira dose dependente, por indução de apoptose (Jones *et al.*, 1994; Bouterfa *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2004). Ainda, a cerivastatina é capaz de inibir a migração celular de linhagens de gliomas humanos (Obara *et al.*, 2002). De maneira similar, a simvastatina é capaz de inibir o crescimento, a migração celular e

ativar cascatas apoptóticas em modelos de glioma *in vitro* (Gliemroth *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2009).

Em relação à guanosina, apesar de todas as funções protetoras e tróficas já descritas, pouco se tem descrito sobre sua ação em células cancerosas. Sabe-se que a guanosina induz diferenciação, aumenta a melanogênese e diminui a motilidade em modelo murino de melanoma (Naliwaiko *et al.*, 2008). Além disso, a associação de guanosina com a acriflavina melhora o efeito antitumoral da acriflavina por meio do bloqueio de transporte de nutrientes e desequilíbrio na produção de ATP *in vivo* (Kim *et al.*, 1997).

Com respeito ao câncer, é de suma importância o direcionamento do estudo para características que conferem malignidade à doença. Essencialmente, células de câncer possuem alterações que acarretam no desbalanço de processos fisiológicos. Tais processos são alterações na viabilidade celular, a migração, a proliferação, os tipos de morte celular e vias de sinalização envolvidas na sobrevivência. Dessa maneira, faz-se necessário o estudo mais específico de alterações nesses processos causadas por compostos, para compreensão tanto do efeito do composto, quanto do mecanismo pelo qual o tumor se desenvolve.

## **6.1. CITOTOXICIDADE E MORTE CELULAR PROGRAMADA**

Diversas estatinas já demonstraram efeito citotóxico em células de glioma *in vitro*, como por exemplo, a metavastatina, fluvastatina, simvastatina, lovastatina e a atorvastatina (Yanae *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2014; Sławińska-Brych *et al.*, 2014). A combinação de estatinas

com anti-inflamatórios e ainda, com inibidores da topoisomerase demonstrou eficácia em reduzir a viabilidade celular de gliomas (Mercurio *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014). Neste trabalho, a Atorvastatina demonstrou potencial citotóxico em células de glioma humano A172, reduzindo a viabilidade celular a níveis similares aos observados com a aplicação da temozolomida, em uma concentração 50 vezes menor do que a utilizada com o quimioterápico (Oliveira *et al.*, 2017).

No que diz respeito ao efeito antitumoral da guanosina, foi demonstrada uma diminuição do peso tumoral em modelo *in vivo* de carcinoma (Kim *et al.*, 1997). O tratamento de cultivo celular de melanoma com guanosina por 48 horas foi capaz de reduzir o crescimento celular e acarretar um processo de diferenciação, alterando o perfil de malignidade das células (Naliwaiko *et al.*, 2008). A guanosina também demonstrou potencial citotóxico em células de glioma humano em concentrações de 500 a 1000 mM (Capítulo II, anexo A, Figura 1), sendo que estas concentrações não apresentam toxicidade ao tecido cerebral nativo (Molz *et al.*, 2009). A associação da guanosina com acriflavina demonstrou melhora do potencial antitumoral desta, em modelo murino de carcinoma (Kim *et al.*, 1997). Ainda, a associação de guanosina a 5'-deoxi'5-fluoridina também foi capaz de melhorar o efeito antitumoral do quimioterápico, tanto em modelo de leucemia quanto em modelo de mastocitoma (Iigo *et al.*, 1987). Nesse aspecto, a combinação de guanosina com TMZ foi testada em células de glioma, entretanto não foi observado nenhum efeito decorrente desta combinação na capacidade redutora destas células, que é utilizada como uma medida indireta de viabilidade. Tanto a guanosina quanto a TMZ

apresentaram significativa redução da viabilidade celular, em níveis similares. Contudo, foi observado um efeito potenciado pela combinação destes compostos na análise de morte celular apoptótica (Capítulo II, anexo A, Figura 5). Assim, foi demonstrado que tanto a atorvastatina quanto a guanosina são capazes de reduzir a viabilidade celular de células de glioma humano A172.

Outro processo chave no desenvolvimento tumoral é a apoptose. Alterações na sinalização celular que regula este processo e um consequente desbalanço pode gerar um crescimento celular descontrolado, originando tumores. Já foi descrito o potencial das estatinas em regular o processo apoptótico. Isso pode ocorrer através da supressão da ativação de vias de sobrevivência, como ERK1/2, e aumento da ativação de vias responsáveis pela ativação da apoptose, como PI3K/Akt/caspase-3 (Bababegy *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Tapia-Pérez *et al.*, 2011; Yanae *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstraram que a atorvastatina *per se* é capaz de aumentar os níveis de apoptose. Ainda, a co-incubação com TMZ causou um efeito potenciado nos níveis de apoptose (Oliveira *et al.*, 2017). Tal efeito pode sugerir a capacidade da atorvastatina de sensibilizar as células de glioma aos efeitos tóxicos do quimioterápico, elevando assim o número de células que entram no processo apoptótico. Contudo, estudos mais específicos acerca da interação entre os fármacos permanecem necessários para elucidar os mecanismos pelos quais exercem este efeito.

Poucos estudos descrevem o efeito da guanosina na ativação de apoptose. A sulfinosina, um análogo de purina, induz apoptose por

meio da ativação de caspase-3 em carcinoma pulmonar e glioblastoma (Dačević *et al.*, 2013). Ainda, a guanosina aumentou ativação de caspase-3 e clivagem da PARP (poli ADP ribose polimerase), engatilhando os processos apoptóticos em modelo de leucemia, sendo que tal mecanismo depende de ativação intracelular pela guanosina (Flanagan *et al.*, 2007). Entretanto, o tratamento de células de melanoma com guanosina não alterou a apoptose (Naliwaiko *et al.*, 2008). Em modelo de hepatoma humano, a guanosina também não alterou a atividade da caspase-3 ou o conteúdo de Fas, indicando uma ausência de efeito deste nucleosídeo neste modelo (Yang *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, o tratamento das células A172 de glioma humano com guanosina não apresentou efeito significativo no número de células apoptóticas. Um aumento nos níveis de apoptose foi observado com a co-incubação de guanosina e TMZ, demonstrando um efeito de sinérgico para ativação deste tipo de morte celular. Além disso, o tratamento combinado de guanosina e TMZ também foi capaz de provocar a diminuição do potencial de membrana mitocondrial nestas células (Capítulo II, anexo A, Figura 5). Tais observações sugerem que a associação destes compostos pode alterar a atividade mitocondrial e favorecer a ativação da apoptose (Ly *et al.*, 2003).

A TMZ, assim como a guanosina, também não alterou os níveis de apoptose. Existem proteínas responsáveis pelo reparo de danos ao DNA as quais são usualmente expressas a fim de evitar a expressão de proteínas danificadas e ainda a ativação de cascatas de morte celular. A O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) é uma das principais proteínas responsáveis por reparar danos ao DNA causados pela TMZ,

dessa maneira, sua expressão é uma das causas de mecanismos de resistência à TMZ (Kondo *et al.*, 2010; Knizhnik *et al.*, 2013). Entretanto, já é sabido que células A172 apresentam baixa expressão de MGMT sendo, dessa maneira, classificadas como sensíveis à TMZ. Em nosso trabalho, a TMZ sozinha não acarretou em um aumento de dano ao DNA em células A172. Um aumento nos níveis de dano ao DNA foi observado quando houve a combinação de TMZ e guanósina (Capítulo II, anexo B, Figura 1). Assim sendo, estes resultados corroboram aos níveis de apoptose e ao potencial de membrana mitocondrial alterados com o tratamento combinado de guanósina e TMZ. Nesse sentido, observamos que a atorvastatina é capaz de aumentar os níveis de apoptose, enquanto que guanósina *per se* não apresentou efeito. Em contra-partida, a combinação de guanósina com TMZ diminuiu o potencial de membrana mitocondrial e aumentou a presença de apoptose.

Outro mecanismo que pode ativar um mecanismo alternativo de morte celular programada é a autofagia. A autofagia é um processo natural, normalmente associado à capacidade de autorrenovação e remoção de proteínas ou organelas danificadas pela ação de lisossomos. A autofagia pode ocorrer de maneira combinada à apoptose, dependendo da sinalização *upstream* ativada nesse processo (Maiuri *et al.*, 2007; Dačević *et al.*, 2013). Estudos têm demonstrado a capacidade de estatinas de ativar morte celular associada à autofagia por meio da regulação da via da mTOR (Yang *et al.*, 2010; Misirkic *et al.*, 2012). A morte celular associada à autofagia não é o principal tipo de morte observado pelo efeito de quimioterápicos, no entanto, células de glioma



tratadas com TMZ podem sofrer esse tipo de morte celular por alterações na via da proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) (Zou *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). A presença de organelas vesiculares ácidas (AVOs) é utilizada como um indicativo da presença de autofagia. Em nosso estudo, observamos um aumento na autofagia desencadeada pelo tratamento com TMZ, assim como pelo tratamento com atorvastatina (Oliveira *et al.*, 2017). Tais resultados podem sugerir que a atorvastatina, mesmo em uma concentração 50 vezes mais baixa que a do quimioterápico, pode causar um prejuízo equivalente na viabilidade das células de glioma A172.

A guanosina não alterou os níveis de AVOs em células de glioma A172, sugerindo que sua toxicidade não é dependente deste processo. Ainda, a combinação de guanosina com TMZ teve efeito similar ao do tratamento somente com TMZ, demonstrando somente o efeito do quimioterápico (Capítulo II, anexo A, Figura 4).

## **6.2. MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR**

A migração celular é uma característica altamente desenvolvida em cânceres e está diretamente relacionada à malignidade e capacidade metastática (Friedl e Wolf, 2003). Estatinas demonstraram habilidade de alterar processos migratórios em células de glioma (Obara *et al.*, 2002; Gliemroth *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2009). A redução do nível de mevalonato pela simvastatina suprime a migração em células de glioma (Wu *et al.*, 2009). Ainda, a lovastatina afeta a regulação do mevalonato

e da ativação de uma das vias que regulam a migração, a Ras-Raf-MEK-ERK, inibindo a migração e a invasão por células de glioma (Afshordel *et al.*, 2015). A redução na expressão de metaloproteinases também é um mecanismo pelo qual estatinas podem diminuir a migração de células de glioma (Yongjun *et al.*, 2013). Nesse aspecto, a atorvastatina também se mostrou capaz de diminuir a migração em células de glioma humano A172 nos mesmos níveis que a TMZ. No entanto, a combinação dos dois fármacos apresentou o mesmo efeito que elas sozinhas e não um efeito somatório (Oliveira, *et al.*, 2017). A análise de migração celular foi feita pelos ensaios de *wound healing* e de *transwell* (ThinCert™), sendo que para o tempo de 48 horas de tratamento o resultado do *transwell* corrobora os resultado do *wound healing*. Os mecanismos pelos quais a atorvastatina altera a migração nestas células ainda estão por ser estudados.

Existem poucas evidências sobre o efeito da guanosina sobre a migração celular. Naliwaiko e colaboradores (Naliwaiko *et al.*, 2008) demonstraram diminuição da motilidade de células de melanoma como efeito do tratamento com guanosina. Em nosso estudo, a guanosina também demonstrou eficácia em diminuir a migração em células de glioma A172 (Capítulo II, anexo B, Figura 2), entretanto, o efeito da guanosina *per se* só foi observado após 48 horas de tratamento e com a utilização do ensaio de *transwell* (Capítulo II, anexo B, Figura 2), método mais sensível para análise da migração celular, uma vez que, no ensaio de *wound healing* só foi observado efeito potenciado com o uso da temozolomida (Capítulo II, anexo A, Figura 3). Essa diferença entre os resultados se dá pela inespecificidade do ensaio de *wound healing*

que pode representar concomitantemente alterações de migração e proliferação. Assim sendo, além da utilização de um ensaio específico para migração, foi também realizado ensaio de imunocitoquímica para marcação do Ki-67, uma proteína nuclear que é expressa em todas as fases ativas do ciclo celular, intrinsecamente relacionada à proliferação celular (Scholzen e Gerdes, 2000). Logo, demonstramos que tanto a atorvastatina quanto a guanosina reduzem a migração de células de glioma humano A172.

A proliferação celular é um processo normal no desenvolvimento e manutenção dos organismos, entretanto, um desbalanço na proliferação é uma característica muito importante e proeminente em cânceres. No tocante ao efeito da guanosina na proliferação de células tumorais, não havia estudos sobre esse efeito. No entanto, nosso trabalho demonstrou pela primeira vez a guanosina reduzindo a proliferação celular em células de glioma (Capítulo II, anexo B, Figura 3). Esse efeito foi prevenido quando da co-incubação com TMZ, porém, mais estudos acerca desse efeito necessitam ser realizados para melhor compreender este mecanismo. Nesse sentido, o efeito da atorvastatina na proliferação também foi analisado. A atorvastatina foi capaz de diminuir a proliferação das células de glioma, enquanto que a TMZ ou a combinação dos dois fármacos não apresentou esse efeito (Oliveira *et al.*, 2017). A redução da proliferação celular como efeito induzido por estatinas já é descrito e em gliomas parece estar relacionado ao bloqueio da sinalização Ras-MAPK (Jones *et al.*, 1994; Bouterfa *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2009). Assim sendo, demonstramos que atorvastatina e guanosina

reduzem a proliferação celular, sendo que com a co-incubação com a TMZ esse efeito não foi observado.

### **6.3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO**

Gliomas apresentam alterações proeminentes no sistema glutamatérgico, seja no transporte ou na sinalização induzida pelo glutamato. Uma relação entre estas alterações no sistema glutamatérgico e o desenvolvimento de gliomas vem sendo considerada como um marcador para a malignidade. Gliomas apresentam uma diminuição na expressão e/ou atividade de transportadores dependentes de sódio, o que pode originar um ambiente excitotóxico para células saudáveis. Tal mecanismo está diretamente relacionado com processos de proliferação e migração das células tumorais (Ye e Sontheimer, 1999; De Groot *et al.*, 2005; De Groot e Sontheimer, 2011). Sabendo-se disso, além do potencial antitumoral da guanosina e da atorvastatina, nosso estudo também analisou a capacidade destes compostos em alterar parâmetros glutamatérgicos. Foram analisadas a liberação de glutamato e a metabolização deste a glutamina, através da atividade da glutamina sintetase (GS). Em estudos anteriores do nosso grupo, a atorvastatina demonstrou capacidade de prevenir o aumento da liberação de glutamato e da atividade da GS induzidas pela privação de glicose e oxigênio em fatias hipocámpais (Vandresen-Filho *et al.*, 2013). Porém, a atorvastatina não alterou a atividade da GS, nem mesmo a TMZ, ou ainda o tratamento combinado dos dois fármacos em células de glioma A172. Com relação ao transporte de glutamato, a atorvastatina não alterou a captação ou a liberação do aminoácido. A TMZ provocou aumento na liberação de glutamato, evento este que pode estar

relacionado aos processos de resistência à droga, entretanto, mais estudos acerca deste mecanismo são necessários (Capítulo I, Anexo A, Figura 7).

Estudos vêm demonstrando que o efeito neuroprotetor da guanosina é dependente da modulação do sistema glutamatérgico, pelo aumento da captação de glutamato ou diminuição da liberação que pode acarretar em aumento da atividade da GS (Moretto *et al.*, 2005; Molz *et al.*, 2011; Dal-Cim *et al.*, 2013). Contudo, o efeito antitumoral da guanosina não parece estar relacionado ao transporte de glutamato ou ainda à metabolização do mesmo à glutamina, visto que o mesmo tratamento que apresentou citotoxicidade às células de glioma A172, não acarretou em alterações nos parâmetros supracitados (Capítulo II, Anexo A, Figura 6). Foi observado que o aumento na liberação de glutamato causado pela TMZ foi prevenido pelo tratamento com guanosina, demonstrando assim o potencial modulatório pelo nucleosídeo sobre o sistema glutamatérgico.

Analisando em mais detalhe a participação do sistema glutamatérgico nos efeitos da guanosina e da atorvastatina, utilizamos uma abordagem farmacológica para analisar o envolvimento de transportadores de glutamato no efeito citotóxico das substâncias. As células de glioma foram pré-incubadas com um inibidor não-seletivo de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) e um inibidor do trocador cistina-glutamato. A inibição de EAATs ou do trocador cistina-glutamato não apresentou alteração no efeito citotóxico da guanosina (Capítulo II, anexo A, Figura 7) e nem da atorvastatina (Oliveira *et al.*, 2017).

Uma vez que foram estudados os mecanismos de transporte do glutamato no efeito dos fármacos, uma análise da possível interação com receptores de glutamato foi realizada. No que concerne à ativação de receptores de glutamato, já se sabe que esta pode estimular a proliferação e a migração em tumores, uma vez que o bloqueio de NMDAR, AMPAR e KAR inibem estes processos (Rzeski *et al.*, 2001; Walczak *et al.*, 2014). A estimulação do influxo de cálcio, pela ativação de AMPAR, pode desencadear a fosforilação de Akt e estimular o crescimento e migração celular de gliomas (Ishiuchi *et al.*, 2007; Lyons *et al.*, 2007). Vem sendo sugerida uma possível correlação entre a expressão/ativação de receptores de glutamato e a malignidade do tumor. Já foi demonstrado que o antagonismo de receptores NMDA em gliomas leva à redução da viabilidade e proliferação celular pela diminuição da fosforilação de ERK1/2 (Stepulak *et al.*, 2005). A estimulação de receptor AMPA também é capaz de regular o crescimento de câncer pulmonar e pancreático, através da modulação da via MAPK (Stepulak *et al.*, 2007; Herner *et al.*, 2011).

Em geral, os estudos tratam sobre as vias de sinalização ativadas por estatinas em células de câncer, mas não existem evidências sobre os alvos de interação das mesmas na membrana celular. Em condições patológicas, as estatinas podem exercer seu efeito neuroprotetor por meio da modulação da transmissão glutamatérgica (Zacco *et al.*, 2003; Gutierrez-Vargas *et al.*, 2014). Em nosso estudo, foi observado que o bloqueio de receptores AMPA, KA, NMDA e ainda receptores metabotrópicos, previne parcialmente o efeito citotóxico da atorvastatina em células de glioma A172 (Oliveira *et al.*, 2017). Dessa maneira, é

possível que receptores de glutamato sejam alvos da citotoxicidade da atorvastatina em células de glioma.

Apesar de evidências que demonstram a capacidade da guanosina de modular o sistema glutamatérgico, em nossos estudos o bloqueio de receptores de glutamato (AMPA, KA, NMDA, mGLU) com antagonistas farmacológicos seletivos, não alterou o efeito citotóxico da guanosina às células de glioma A172 (Capítulo II, Anexo A, Figura 7).

Em resumo, a atorvastatina não altera a atividade da GS e o transporte de glutamato, entretanto seu efeito citotóxico é parcialmente prevenido pelo bloqueio de receptores de glutamato. Com relação à guanosina, o composto não altera a atividade da GS e nem o transporte de glutamato, mas é capaz de prevenir o aumento na liberação de glutamato causado pela TMZ. Ainda, o efeito citotóxico da guanosina não parece estar relacionado ao transporte e/ou ativação dos receptores de glutamato.

#### **6.4. SISTEMA ADENOSINÉRGICO**

Já foi relatado que alterações glutamatérgicas não podem, *per se*, explicar a complexidade do desenvolvimento do glioma, assim vem sendo sugerido o envolvimento do sistema purinérgico na progressão da doença (Braganhof *et al.*, 2013). A ativação de receptores de adenosina promove a apoptose em células de câncer colorretal, carcinoma e osteosarcoma (Antonioli *et al.*, 2013). Diversos efeitos neuroprotetores

exercidos pela guanosina tem demonstrado relação com a ativação de receptores de adenosina (Ciruela, 2013; Dal-Cim *et al.*, 2013). Em nosso estudo, tanto o bloqueio de A<sub>1</sub>R ou A<sub>2A</sub>R quanto a ativação de A<sub>2A</sub>R interfere parcialmente no efeito citotóxico exercido pela guanosina em células de glioma. O bloqueio de A<sub>1</sub>R e A<sub>2A</sub>R concomitantemente diminuiu a viabilidade das células, enquanto que o bloqueio de A<sub>1</sub>R e ativação de A<sub>2A</sub>R não apresentou esse efeito (Capítulo II, Anexo A, Figura 8). A ativação de receptores de adenosina em câncer tem demonstrado efeito dual em cascatas de sobrevivência e morte. A ativação de receptores A<sub>1</sub> de adenosina inibe a proliferação em linhagem metastática (Ceruti e Abbracchio, 2013). Além disso, a ativação de A<sub>2A</sub>R ativa a morte celular em células de melanoma (Merighi *et al.*, 2003). Dessa maneira, a interação existente entre a guanosina e receptores de adenosina em células de glioma e os possíveis mecanismos de ação ativados ainda necessitam ser melhor investigados.

Entretanto, a ativação de receptores de adenosina pode afetar as células de gliomas com relação ao efeito citotóxico de quimioterápicos (Daniele *et al.*, 2014; D'alimonte *et al.*, 2015). Ainda, a ativação destes receptores pode ativar cascatas apoptóticas, com aumento de BAX e BAD, alteração do potencial de membrana mitocondrial e aumento do efluxo de citocromo C (Antonioli *et al.*, 2013). Nesse aspecto, é possível que a provável ativação de receptores de adenosina exercida pela guanosina em células de glioma possa sensibilizar tais células à ação da TMZ. Contudo, são necessários mais estudos sobre a interação entre estes compostos e seus possíveis efeitos.



## 6.5. SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

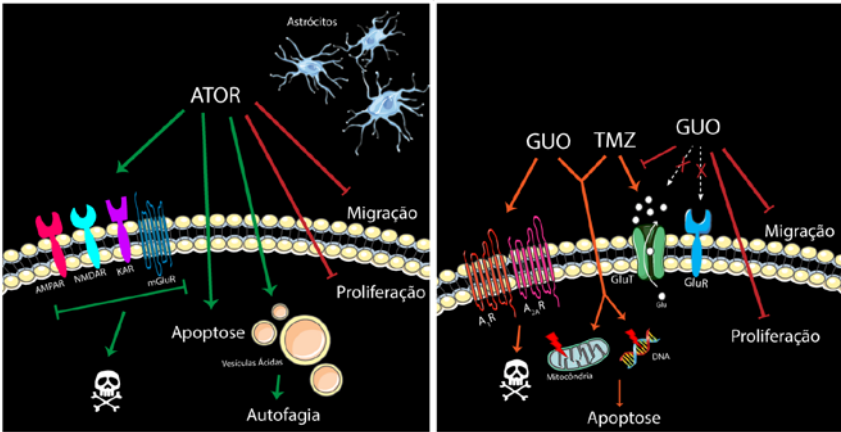
O passo seguinte do trabalho foi analisar as possíveis cascatas intracelulares ativadas pela atorvastatina e guanosina, relacionadas aos efeitos citotóxicos exercidos em células de glioma. As duas principais vias envolvidas no processo de proliferação celular em gliomas são a da PI3K/Akt/mTOR e Ras/MEK/MAPK. O aumento da PI3K leva a um aumento da ativação de Akt, que por sua vez ativa mTOR e esta regula diversas cascatas de sinalização envolvidas na proliferação e apoptose. Crescimento e proliferação celular descontrolados podem estar relacionados à elevação da fosforilação de MEK e MAPK (Akhavan *et al.*, 2010; Nakada *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2012). Estudos anteriores demonstraram que a guanosina apresentou potencial em modular tais cascatas, exercendo seus efeitos neuroprotetores e neurotróficos (Lanznaster *et al.*, 2016). Entretanto, apesar de em nosso estudo a guanosina diminuir a proliferação celular, não foi observada alteração do efeito citotóxico da guanosina com a inibição da MEK (Capítulo II, Anexo B, Figura 4). Todavia, mais estudos são necessários para investigar MAP/ERK. No que diz respeito à atorvastatina, já foi demonstrado que a inibição da via MEK/ERK é capaz de reverter a neuroproteção exercida pela estatina, contra a neurotoxicidade induzida por ácido quinolínico (Vandresen-Filho *et al.*, 2016). Contudo, o efeito antitumoral da atorvastatina não tem relação com a ativação de MEK, visto que sua inibição não alterou o efeito da atorvastatina na viabilidade celular (Capítulo I, Figura 11a),

Estudos anteriores do nosso grupo comprovam que os efeitos neuroprotetores da guanosina estão diretamente relacionados à ativação da via PI3K/Akt/mTOR e MAPK/ERK, por meio da possível interação com receptores de adenosina (Molz *et al.*, 2011; Dal-Cim *et al.*, 2012; Dal-Cim *et al.*, 2013; Lanznaster *et al.*, 2016). Visto que observamos alteração do efeito citotóxico da guanosina pelo antagonismo de receptores de adenosina, foi analisado o envolvimento de vias acionadas em decorrência da ativação destes receptores. Foi observado que a inibição da PI3K e mTOR não previnem o efeito citotóxico da guanosina, mas sim o potenciam. Tais resultados podem sugerir que células tratadas com guanosina dependem da ativação da PI3K e mTOR para manutenção da sobrevivência e a inibição dessa via potencia o efeito citotóxico da guanosina (Capítulo II, Anexo B, Figuras 6).

Relativamente à atorvastatina e a regulação da via PI3K e mTOR, já foi demonstrado que a inibição destas é capaz de prevenir o efeito tipo antidepressivo induzido pela atorvastatina (Ludka *et al.*, 2016). Ainda, a atorvastatina é capaz de induzir neuritogênese via ativação da via PI3K/Akt/mTOR em cultivo de neurônios corticais (Jin *et al.*, 2012). Apesar destas evidências, em nosso estudo a inibição da PI3K e mTOR não alterou o efeito citotóxico da atorvastatina (Capítulo I, Figura 11b), sugerindo que seu efeito antitumoral se dá pela regulação destas vias. Estes dados corroboram com os resultados obtidos por Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2009), que descrevem que a inibição da mTOR e co-tratamento com atorvastatina não alteram o volume tumoral e taxa de sobrevivência em modelo murino de esclerose tuberosa. Por consequência, ainda são

necessários mais estudos acerca das vias de sinalização intracelulares relacionadas à citotoxicidade da atorvastatina à células de glioma.

Finalizamos este trabalho ressaltando a importância dos resultados obtidos, visto que ampliam os conhecimentos relativos aos efeitos da guanosina e da atorvastatina. Identificamos uma ação citotóxica sobre células tumorais, mais especificamente células oriundas de glioma humano, e iniciamos o estudo dos mecanismos envolvidos neste efeito citotóxico da Atorvastatina e Guanosina (Figura 11). Desta forma, além da ação neuroprotetora já elucidada, descrevemos uma nova proposta de efeito para cada um dos compostos. O entendimento destes mecanismos é de grande valia, visto que se trata de compostos não tóxicos e que apresentam poucos e bem tolerados efeitos colaterais. O desenvolvimento desta tese de Doutorado, iniciando o processo de elucidação dos efeitos citotóxicos da atorvastatina e guanosina sobre células de glioma, almeja contribuir para a identificação de novas abordagens para o tratamento desta doença.



**Figura 1: Esquema representando os efeitos da atorvastatina e da guanosina em células de glioma A172.** As células foram tratadas com Atorvastatina (ATOR), ou Guanosina (GUO), ou Temozolamida (TMZ), ou GUO+TMZ por 48 horas e parâmetros característicos de tumores foram avaliados. A atorvastatina reduziu a viabilidade celular, perdendo parcialmente este efeito com o bloqueio de receptores de glutamato. Ainda, reduziu a proliferação e a migração e induziu a apoptose e autofagia. A guanosina também reduziu a viabilidade celular, cujo efeito foi parcialmente perdido pelo bloqueio dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>. Ainda, diminuiu a migração e proliferação e combinada à TMZ induziu diminuição do potencial de membrana mitocondrial, dano ao DNA e apoptose.

## 7. CONCLUSÕES

- A atorvastatina apresenta efeito citotóxico contra células de glioma humano A172, entretanto a concentração de atorvastatina que causa toxicidade ao glioma não altera a viabilidade celular de astrócitos;
- A atorvastatina reduz a migração e proliferação celular em células de glioma A172;
- A atorvastatina induz a apoptose em gliomas A172 e esse efeito é aumentado pela co-incubação com temolozomida;
- A atorvastatina desencadeia o aumento de organelas vesiculares ácidas, indicando um aumento na autofagia;
- A efeito citotóxico da atorvastatina é parcialmente prevenido pelo bloqueio de AMPAR, NMDAR, KAR e mGluR, indicando o envolvimento destes receptores nos eventos que desencadeiam a redução da viabilidade pela atorvastatina;
- A atorvastatina não acarreta dano ao DNA, entretanto causa uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial;
- As proteínas de sinalização de sobrevivência celular, PKA, CaMKII, MEK, PKC, PI3K e mTOR parecem não estar envolvidas no potencial citotóxico da atorvastatina;
- A guanosina também apresenta potencial citotóxico em células de glioma humano A172;
- A guanosina é capaz de reduzir a migração e proliferação em células de glioma humano, bem como o aumento na autofagia;

- O tratamento combinado de guanosina e temozolomida desencadeia uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, bem como um aumento no dano ao DNA e nos níveis de apoptose;
- A guanosina é capaz de prevenir o aumento da liberação de glutamato desencadeado pela temozolomida;
- A inibição dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  de adenosina é capaz de prevenir parcialmente o efeito citotóxico da guanosina.
- A inibição concomitante dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  reduz a viabilidade das células de glioma. Entretanto a inibição do receptor  $A_1$  e a ativação do receptor  $A_{2A}$  não altera a viabilidade e não protege as células de glioma do efeito citotóxico da guanosina.
- A inibição da mTOR e da PI3K potenciou o efeito citotóxico da guanosina.

## 8. PERSPECTIVAS

- Ampliar o estudo das vias de sinalização intracelulares envolvidas no efeito citotóxico da atorvastatina;
- Avaliar o efeito do tratamento atorvastatina em cocultivo de células de glioma e astrócitos corticais;
- Avaliar o efeito da atorvastatina em outras linhagens tumorais e em modelo de implantação xenográfica de gliomas *in vivo*;
- Ampliar o estudo das vias de sinalização envolvidas no efeito citotóxico da guanosina;
- Estudar receptores e vias de sinalização envolvidas no efeito do tratamento combinado de guanosina e temozolomida;
- Avaliar o efeito do tratamento com guanosina e temozolomida em modelo *in vivo*.





## 9. REFERÊNCIAS

ADAM, S. S.; HOPPE, C. Potential role for statins in sickle cell disease. **Pediatr Blood Cancer**, v. 60, n. 4, p. 550-7, Apr 2013. ISSN 1545-5017. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23281161> >.

AFSHORDEL, S. et al. Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation--impact of Ras-/Rho-prenylation. **Pharmacol Res**, v. 91, p. 69-77, Jan 2015. ISSN 1096-1186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497898> >.

AGNIHOTRI, S. et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 61, n. 1, p. 25-41, Feb 2013. ISSN 1661-4917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224339> >.

AKHAVAN, D.; CLOUGHESY, T. F.; MISCHEL, P. S. mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. **Neuro Oncol**, v. 12, n. 8, p. 882-9, Aug 2010. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472883> >.

ALI-VON LAUE, C. et al. Improving topical non-melanoma skin cancer treatment: In vitro efficacy of a novel guanosine-analog phosphonate. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 27, n. 4, p. 173, 2014. ISSN 1660-5535. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24503861> >.

ANAI, S. et al. Antitumor effect of fibrin glue containing temozolomide against malignant glioma. **Cancer Sci**, v. 105, n. 5, p. 583-91, May 2014. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24673719> >.

ANTONIOLI, L. et al. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 12, p. 842-57, Dec 2013. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24226193> >.

ARVANITIS, D. et al. Ras p21 expression in brain tumors: elevated expression in malignant astrocytomas and glioblastomas multiforme. **In Vivo**, v. 5, n. 4, p. 317-21, 1991 Jul-Aug 1991. ISSN 0258-851X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1667267> >.

BABABEYGY, S. R. et al. HMG-CoA reductase inhibition causes increased necrosis and apoptosis in an in vivo mouse glioblastoma multiforme model. **Anticancer Res**, v. 29, n. 12, p. 4901-8, Dec 2009. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20044596> >.

BOLD, R. J.; TERMUHLEN, P. M.; MCCONKEY, D. J. Apoptosis, cancer and cancer therapy. **Surg Oncol**, v. 6, n. 3, p. 133-42, Nov 1997. ISSN 0960-7404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576629> >.

BOUTERFA, H. L. et al. Inhibition of Ras farnesylation by lovastatin leads to downregulation of proliferation and migration in primary cultured human glioblastoma cells. **Anticancer Res**, v. 20, n. 4, p. 2761-71, 2000 Jul-Aug 2000. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953355> >.

BRAGANHOL, E. et al. Purinergic signaling in glioma progression. **Adv Exp Med Biol**, v. 986, p. 81-102, 2013. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22879065> >.

BRUIN, J. E. et al. Increased pancreatic beta-cell apoptosis following fetal and neonatal exposure to nicotine is mediated via the mitochondria. **Toxicol Sci**, v. 103, n. 2, p. 362-70, Jun 2008. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203686> >.

BUCKINGHAM, S. C. et al. Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. **Nat Med**, v. 17, n. 10, p. 1269-74, Oct 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909104> >.

BÖSEL, J. et al. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. **J Neurochem**, v. 92, n. 6, p. 1386-98, Mar 2005. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15748157> >.

CERUTI, S.; ABBRACCHIO, M. P. Adenosine signaling in glioma cells. **Adv Exp Med Biol**, v. 986, p. 13-30, 2013. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22879062> >.

CHEN, S. et al. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1806, n. 2, p. 220-9, Dec 2010. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637264> >.

CHUNG, W. J. et al. Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. **J Neurosci**, v. 25, n. 31, p. 7101-10, Aug 2005. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079392> >.

CIRUELA, F. Guanosine behind the scene. **J Neurochem**, v. 126, n. 4, p. 425-7, Aug 2013. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23815178> >.

CIRUELA, F. et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. **J Neurosci**, v. 26, n. 7, p. 2080-7, Feb 2006. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16481441> >.

CLANCY, Z. et al. Statins and colorectal cancer risk: a longitudinal study. **Cancer Causes Control**, v. 24, n. 4, p. 777-82, Apr 2013. ISSN 1573-7225. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23361340> >.

D'ALIMONTE, I. et al. Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells. **J Immunol**, v. 178, n. 2, p. 720-31, Jan 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202332> >.

\_\_\_\_\_. Potentiation of temozolomide antitumor effect by purine receptor ligands able to restrain the in vitro growth of human glioblastoma stem cells. **Purinergic Signal**, v. 11, n. 3, p. 331-46, Sep 2015. ISSN 1573-9546. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25976165> >.

DAL-CIM, T. et al. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **J Neurochem**, v. 126, n. 4, p. 437-50, Aug 2013. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23713463> >.

\_\_\_\_\_. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neuroscience**, v. 183, p. 212-20, Jun 2011. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21435378> >.

\_\_\_\_\_. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. **Neurochem Int**, v. 61, n. 3, p. 397-404, Aug 2012. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683349> >.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369436> >.

DANIELE, S. et al. Modulation of A1 and A2B adenosine receptor activity: a new strategy to sensitise glioblastoma stem cells to chemotherapy. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1539, Nov 2014. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25429616> >.

DAČEVIĆ, M. et al. Purine nucleoside analog--sulfinosine modulates diverse mechanisms of cancer progression in multi-drug resistant cancer cell lines. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54044, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23326571> >.

DE GROOT, J.; SONTHEIMER, H. Glutamate and the biology of gliomas. **Glia**, v. 59, n. 8, p. 1181-9, Aug 2011. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192095> >.

DE GROOT, J. F. et al. The excitatory amino acid transporter-2 induces apoptosis and decreases glioma growth in vitro and in vivo. **Cancer**

**Res**, v. 65, n. 5, p. 1934-40, Mar 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753393> >.

DE SALDANHA DA GAMA FISCHER, J. et al. Chemo-resistant protein expression pattern of glioblastoma cells (A172) to perillyl alcohol. **J Proteome Res**, v. 10, n. 1, p. 153-60, Jan 2011. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20806975> >.

DECKER, H. et al. Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 9, p. 1943-51, Jul 2007. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17526012> >.

DEMUTH, T.; BERENS, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **J Neurooncol**, v. 70, n. 2, p. 217-28, Nov 2004. ISSN 0167-594X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15674479> >.

DESJARDINS, A. et al. Chemotherapy and novel therapeutic approaches in malignant glioma. **Front Biosci**, v. 10, p. 2645-68, 2005. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970525> >.

EGEA, J. et al. Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. **J Neurochem**, v. 102, n. 6, p. 1842-52, Sep 2007. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540012> >.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342-8, May 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357141> >.

FAVERO, G. M. et al. Simvastatin impairs murine melanoma growth. **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 142, 2010. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21162733> >.

FERRARO, E.; CECCONI, F. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 462, n. 2,

p. 210-9, Jun 2007. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374522> >.

FLANAGAN, S. A.; GANDHI, V.; MECKLING, K. A. Guanosine acts intracellularly to initiate apoptosis in NB4 cells: A role for nucleoside transport. **Leuk Lymphoma**, v. 48, n. 9, p. 1816-27, Sep 2007. ISSN 1042-8194. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786719> >.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362-74, May 2003. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724734> >.

FRIZZO, M. E. et al. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. **Cell Mol Neurobiol**, v. 22, n. 3, p. 353-63, Jun 2002. ISSN 0272-4340. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12469876> >.

\_\_\_\_\_. Guanosine enhances glutamate transport capacity in brain cortical slices. **Cell Mol Neurobiol**, v. 25, n. 5, p. 913-21, Aug 2005. ISSN 0272-4340. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16133942> >.

GHOBRIAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J Clin**, v. 55, n. 3, p. 178-94, 2005 May-Jun 2005. ISSN 0007-9235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890640> >.

GLIEMROTH, J. et al. Migration, proliferation, and invasion of human glioma cells following treatment with simvastatin. **Neurosurg Rev**, v. 26, n. 2, p. 117-24, May 2003. ISSN 0344-5607. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12962298> >.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, n. 6257, p. 425-30, Feb 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1967820> >.

GOTTFRIED, C. et al. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to

oxidative stress induced by H(2)O(2). **Mech Ageing Dev**, v. 123, n. 10, p. 1333-40, Jul 2002. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297336> >.

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2891-906, Apr 2004. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077152> >.

GUTIERREZ-VARGAS, J. A. et al. GluN2B N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mediates atorvastatin-Induced neuroprotection after focal cerebral ischemia. **J Neurosci Res**, v. 92, n. 11, p. 1529-48, Nov 2014. ISSN 1097-4547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24939000> >.

HAN, J.; CHEN, Q. MiR-16 modulate temozolomide resistance by regulating BCL-2 in human glioma cells. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 10, p. 12698-707, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722459> >.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annu Rev Genet**, v. 43, p. 67-93, 2009. ISSN 1545-2948. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19653858> >.

HERNER, A. et al. Glutamate increases pancreatic cancer cell invasion and migration via AMPA receptor activation and Kras-MAPK signaling. **Int J Cancer**, v. 129, n. 10, p. 2349-59, Nov 2011. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21207374> >.

IIGO, M. et al. Potentiation of the chemotherapeutic action of 5'-deoxy-5-fluorouridine in combination with guanosine and related compounds. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 19, n. 1, p. 61-4, 1987. ISSN 0344-5704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3028664> >.

ISHIUCHI, S. et al. Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation. **J Neurosci**, v. 27, n. 30, p. 7987-8001, Jul 2007. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17652589> >.

JACOBSEN, W. et al. Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. **Drug Metab Dispos**, v. 28, n. 11, p. 1369-78, Nov 2000. ISSN 0090-9556. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11038166> >.

JIANG, P. et al. Novel anti-glioblastoma agents and therapeutic combinations identified from a collection of FDA approved drugs. **J Transl Med**, v. 12, p. 13, 2014. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24433351> >.

JIANG, S. et al. Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. **Neuroreport**, v. 14, n. 18, p. 2463-7, Dec 2003. ISSN 0959-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14663211> >.

JIANG, Y.; UHRBOM, L. On the origin of glioma. **Ups J Med Sci**, v. 117, n. 2, p. 113-21, May 2012. ISSN 2000-1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348397> >.

JIANG, Z. et al. Lovastatin-induced up-regulation of the BH3-only protein, Bim, and cell death in glioblastoma cells. **J Neurochem**, v. 89, n. 1, p. 168-78, Apr 2004. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15030401> >.

JIN, Y. et al. Atorvastatin enhances neurite outgrowth in cortical neurons in vitro via up-regulating the Akt/mTOR and Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathways. **Acta Pharmacol Sin**, v. 33, n. 7, p. 861-72, Jul 2012. ISSN 1745-7254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22705730> >.

JONES, K. D. et al. Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 205, n. 3, p. 1681-7, Dec 1994. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7811252> >.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **J Vis Exp**, n. 88, Jun 2014. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962652> >.



KANAI, Y.; HEDIGER, M. A. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. **Eur J Pharmacol**, v. 479, n. 1-3, p. 237-47, Oct 2003. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14612154> >.

KANTOLA, T.; KIVISTÖ, K. T.; NEUVONEN, P. J. Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. **Clin Pharmacol Ther**, v. 64, n. 1, p. 58-65, Jul 1998. ISSN 0009-9236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9695720> >.

KENNY, P. J.; MARKOU, A. The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 5, p. 265-72, May 2004. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120493> >.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 1, p. 4-29, Apr 2005. ISSN 0033-3158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731895> >.

KIM, S. G. et al. Enhanced anti-tumour effects of acriflavine in combination with guanosine in mice. **J Pharm Pharmacol**, v. 49, n. 2, p. 216-22, Feb 1997. ISSN 0022-3573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9055199> >.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, v. 8, n. 4, p. 445-544, Apr 2012. ISSN 1554-8635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966490> >.

KNIGHT, B. et al. Visualizing muscle cell migration in situ. **Curr Biol**, v. 10, n. 10, p. 576-85, May 2000. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837222> >.

KNIZHNIK, A. V. et al. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55665, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23383259> >.

KONDO, N. et al. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. **J Nucleic Acids**, v. 2010, p. 543531, Nov 2010. ISSN 2090-021X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21113301> >.

KOREN, M. J.; HUNNINGHAKE, D. B.; INVESTIGATORS, A. Clinical outcomes in managed-care patients with coronary heart disease treated aggressively in lipid-lowering disease management clinics: the alliance study. **J Am Coll Cardiol**, v. 44, n. 9, p. 1772-9, Nov 2004. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519006> >.

LANZMASTER, D. et al. Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. **Aging Dis**, v. 7, n. 5, p. 657-679, Oct 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27699087> >.

LARA, D. R. et al. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. **Brain Res**, v. 912, n. 2, p. 176-80, Sep 2001. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532434> >.

LEE, N. et al. Rapamycin weekly maintenance dosing and the potential efficacy of combination sorafenib plus rapamycin but not atorvastatin or doxycycline in tuberous sclerosis preclinical models. **BMC Pharmacol**, v. 9, p. 8, Apr 2009. ISSN 1471-2210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19368729> >.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Dev Cell**, v. 6, n. 4, p. 463-77, Apr 2004. ISSN 1534-5807. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068787> >.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 89-118, 2005. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15822172> >.

LICARETE, E.; SESARMAN, A.; BANCIU, M. Exploitation of pleiotropic actions of statins by using tumour-targeted delivery systems. **J Microencapsul**, p. 1-13, Aug 2015. ISSN 1464-5246. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26299551> >.

**LIU. Mosaic analysis with double markers (MADM) reveal tumor cell-of-origin in glioma.**

LIU, B. et al. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. **Acta Pharmacol Sin**, v. 31, n. 9, p. 1154-64, Sep 2010. ISSN 1745-7254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694022> >.

LIU, C. et al. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. **Cell**, v. 146, n. 2, p. 209-21, Jul 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737130> >.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 114, n. 2, p. 97-109, Aug 2007. ISSN 0001-6322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618441> >.

LUDKA, F. K. et al. Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  and mTOR in the antidepressant-like effect of atorvastatin in mice. **J Psychiatr Res**, v. 82, p. 50-7, Nov 2016. ISSN 1879-1379. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27468164> >.

LY, J. D.; GRUBB, D. R.; LAWEN, A. The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis; an update. **Apoptosis**, v. 8, n. 2, p. 115-28, Mar 2003. ISSN 1360-8185. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766472> >.

LYONS, S. A. et al. Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. **Cancer Res**, v. 67, n. 19, p. 9463-71, Oct 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17909056> >.

MAIURI, M. C. et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 9, p. 741-52, Sep 2007. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717517> >.

MAO, H. et al. Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets. **Cancer**

**Invest**, v. 30, n. 1, p. 48-56, Jan 2012. ISSN 1532-4192. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22236189> >.

MATTSON, M. P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. **Neuromolecular Med**, v. 3, n. 2, p. 65-94, 2003. ISSN 1535-1084. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728191> >.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S-15S, Apr 2000. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736372> >.

MERCURIO, S. et al. Evidence for new targets and synergistic effect of metronomic celecoxib/fluvoastatin combination in pilocytic astrocytoma. **Acta Neuropathol Commun**, v. 1, p. 17, 2013. ISSN 2051-5960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252689> >.

MERIGHI, S. et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. **Pharmacol Ther**, v. 100, n. 1, p. 31-48, Oct 2003. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14550503> >.

MIIDA, T.; TAKAHASHI, A.; IKEUCHI, T. Prevention of stroke and dementia by statin therapy: experimental and clinical evidence of their pleiotropic effects. **Pharmacol Ther**, v. 113, n. 2, p. 378-93, Feb 2007. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17113151> >.

MISIRKIC, M. et al. Inhibition of AMPK-dependent autophagy enhances in vitro antiglioma effect of simvastatin. **Pharmacol Res**, v. 65, n. 1, p. 111-9, Jan 2012. ISSN 1096-1186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871960> >.

MOLZ, S. et al. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 9, p. 1400-8, Sep 2011. ISSN 1097-4547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671255> >.

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. **Neurochem Int**, v. 55, n. 7, p. 703-9, Dec 2009. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19576258> >.

MONTEIRO, G. T.; KOIFMAN, S. [Brain tumors mortality in Brazil, 1980-1998]. **Cad Saude Publica**, v. 19, n. 4, p. 1139-51, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12973578> >.

MORETTO, M. B. et al. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. **Exp Neurol**, v. 195, n. 2, p. 400-6, Oct 2005. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051218> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A silver staining method for single-cell gel assay. **J Histochem Cytochem**, v. 49, n. 9, p. 1183-6, Sep 2001. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511687> >.

NAKADA, M. et al. Aberrant signaling pathways in glioma. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 3, p. 3242-78, Aug 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212955> >.

NALIWAIKO, K. et al. Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway. **Chem Biol Interact**, v. 173, n. 2, p. 122-8, May 2008. ISSN 0009-2797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18456249> >.

NEWLANDS, E. S. et al. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treat Rev**, v. 23, n. 1, p. 35-61, Jan 1997. ISSN 0305-7372. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9189180> >.

NOCH, E.; KHALILI, K. Molecular mechanisms of necrosis in glioblastoma: the role of glutamate excitotoxicity. **Cancer Biol Ther**, v. 8, n. 19, p. 1791-7, Oct 2009. ISSN 1555-8576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19770591> >.

OBARA, S. et al. Inhibition of migration of human glioblastoma cells by cerivastatin in association with focal adhesion kinase (FAK). **Cancer Lett**, v. 185, n. 2, p. 153-61, Nov 2002. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169389> >.

OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res**, v. 64, n. 19, p. 6892-9, Oct 2004. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466178> >.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathol**, v. 109, n. 1, p. 93-108, Jan 2005a. ISSN 0001-6322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15685439> >.

\_\_\_\_\_. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 64, n. 6, p. 479-89, Jun 2005b. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15977639> >.

\_\_\_\_\_. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Sci**, v. 100, n. 12, p. 2235-41, Dec 2009. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737147> >.

OSTROM, Q. T. et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. **Neuro Oncol**, v. 16, n. 7, p. 896-913, Jul 2014. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24842956> >.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif**, v. 45, n. 6, p. 487-98, Dec 2012. ISSN 1365-2184. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23030059> >.

PANNU, R. et al. Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. **J Neurochem**, v. 101, n. 1, p. 182-200, Apr 2007. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17217414> >.

PERSSON, A. I. et al. Non-stem cell origin for oligodendroglioma. **Cancer Cell**, v. 18, n. 6, p. 669-82, Dec 2010. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156288> >.

PIERMARTIRI, T. C. et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- $\beta$ (1-40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Exp Neurol**, v. 226, n. 2, p. 274-84, Dec 2010. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816828> >.

\_\_\_\_\_. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. **Neurotox Res**, v. 16, n. 2, p. 106-15, Aug 2009. ISSN 1476-3524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19526287> >.

PITTENGER, C.; BLOCH, M. H.; WILLIAMS, K. Glutamate abnormalities in obsessive compulsive disorder: neurobiology, pathophysiology, and treatment. **Pharmacol Ther**, v. 132, n. 3, p. 314-32, Dec 2011. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963369> >.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. **J Neurochem**, v. 130, n. 1, p. 61-74, Jul 2014. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24673378> >.

RADER, D. J. Therapy to reduce risk of coronary heart disease. **Clin Cardiol**, v. 26, n. 1, p. 2-8, Jan 2003. ISSN 0160-9289. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12539806> >.

RAINOV, N. G.; SÖLING, A.; HEIDECHE, V. Novel therapies for malignant gliomas: a local affair? **Neurosurg Focus**, v. 20, n. 4, p. E9,

2006. ISSN 1092-0684. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709040>>.

RATHBONE, M. et al. Neurotrophic effects of extracellular guanosine. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 27, n. 6, p. 666-72, Jun 2008. ISSN 1532-2335. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600524>>.

RATHBONE, M. P. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Prog Neurobiol**, v. 59, n. 6, p. 663-90, Dec 1999. ISSN 0301-0082. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845757>>.

REARDON, D. A. et al. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 8, p. 1253-65, Mar 2006. ISSN 1527-7755. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16525180>>.

RIDLEY, A. J. et al. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1704-9, Dec 2003. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657486> >.

ROBERT, S. M.; SONTHEIMER, H. Glutamate transporters in the biology of malignant gliomas. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 10, p. 1839-54, May 2014. ISSN 1420-9071. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24281762>>.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 9, p. 440-50, Sep 2006. ISSN 1471-4914. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899408>>.

ROTHSTEIN, J. D. et al. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 14, p. 6591-5, Jul 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8393571>>.

RZESKI, W.; TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C. Glutamate antagonists limit tumor growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 11, p. 6372-7, May 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331750>>.



SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 19, n. 1, p. 117-25, Feb 2005. ISSN 0767-3981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15660968> >.

SCHMIDT, A. P.; AVILA, T. T.; SOUZA, D. O. Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. **Neurochem Res**, v. 30, n. 1, p. 69-73, Jan 2005. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15756934> >.

SCHMIDT, A. P. et al. Antinociceptive effects of intracerebroventricular administration of guanine-based purines in mice: evidences for the mechanism of action. **Brain Res**, v. 1234, p. 50-8, Oct 2008. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708036> >.

\_\_\_\_\_. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by guanosine in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 613, n. 1-3, p. 46-53, Jun 2009. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379722> >.

\_\_\_\_\_. Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of guanosine in mice. **Br J Pharmacol**, v. 159, n. 6, p. 1247-63, Mar 2010. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132210> >.

\_\_\_\_\_. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Res**, v. 864, n. 1, p. 40-3, May 2000. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793184> >.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol**, v. 182, n. 3, p. 311-22, Mar 2000. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653597> >.

SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. **Neurotox Res**,

v. 8, n. 3-4, p. 221-5, Nov 2005. ISSN 1029-8428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371316> >.

SCHULZE-OSTHOFF, K. et al. Apoptosis signaling by death receptors. **Eur J Biochem**, v. 254, n. 3, p. 439-59, Jun 1998. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688254> >.

SCHWARTZ, G. G. et al. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 285, n. 13, p. 1711-8, Apr 2001. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11277825> >.

SHIMIZU, S. et al. Autophagic cell death and cancer. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 2, p. 3145-53, Feb 2014. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24566140> >.

SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacol Ther**, v. 112, n. 1, p. 71-105, Oct 2006. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16714062> >.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-91, Mar 1988. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3345800> >.

SINGH, S. et al. Statins are associated with reduced risk of esophageal cancer, particularly in patients with Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 6, p. 620-9, Jun 2013. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357487> >.

SINGH, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396-401, Nov 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549107> >.

STEIN, E. A. Management of dyslipidemia in the high-risk patient. **Am Heart J**, v. 144, n. 6 Suppl, p. S43-50, Dec 2002. ISSN 1097-6744. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486415> >.

STEPULAK, A. et al. AMPA antagonists inhibit the extracellular signal regulated kinase pathway and suppress lung cancer growth. **Cancer Biol Ther**, v. 6, n. 12, p. 1908-15, Dec 2007. ISSN 1555-8576. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059166> >.

\_\_\_\_\_. NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 43, p. 15605-10, Oct 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16230611> >.

STUPP, R. et al. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, v. 25 Suppl 3, p. iii93-101, Sep 2014. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782454> >.

SU, C. et al. Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 3, p. 617-25, Feb 2009. ISSN 1097-4547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18816792> >.

\_\_\_\_\_. Guanosine-induced decrease in side population of lung cancer cells: lack of correlation with ABCG2 expression. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 24, n. 1, p. 19-25, 2010 Jan-Mar 2010. ISSN 0393-974X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385068> >.

\_\_\_\_\_. Guanosine promotes proliferation of neural stem cells through cAMP-CREB pathway. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 27, n. 3, p. 673-80, 2013 Jul-Sep 2013. ISSN 0393-974X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24152836> >.

SZYDLOWSKA, K.; TYMIANSKI, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 47, n. 2, p. 122-9, Feb 2010. ISSN 1532-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167368> >.

SŁAWIŃSKA-BRYCH, A.; ZDZISIŃSKA, B.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M. Fluvastatin inhibits growth and alters the malignant phenotype of the C6 glioma cell line. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 1, p. 121-9, Feb 2014. ISSN 1734-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905317> >.

TAN, M. L. et al. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. **Pharm Res**, v. 26, n. 7, p. 1547-60, Jul 2009. ISSN 1573-904X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407932> >.

TAPIA-PÉREZ, J. H. et al. Cytotoxic effect of different statins and thiazolidinediones on malignant glioma cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 67, n. 5, p. 1193-201, May 2011. ISSN 1432-0843. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21120479> >.

THOMAZI, A. P. et al. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. **Mech Ageing Dev**, v. 125, n. 7, p. 475-81, Jul 2004. ISSN 0047-6374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246742> >.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000. ISSN 0893-6692. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737956> >.

VAN AELST, L.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes Dev**, v. 11, n. 18, p. 2295-322, Sep 1997. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9308960> >.

VANDRESEN-FILHO, S. et al. Atorvastatin prevents cell damage via modulation of oxidative stress, glutamate uptake and glutamine synthetase activity in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. **Neurochem Int**, v. 62, n. 7, p. 948-55, Jun 2013. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500607> >.

\_\_\_\_\_. Atorvastatin Prevents Glutamate Uptake Reduction Induced by Quinolinic Acid Via MAPKs Signaling. **Neurochem Res**, v. 41, n. 8, p.

2017-28, Aug 2016. ISSN 1573-6903. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27084771> >.

VINADÉ, E. R. et al. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. **Brain Res**, v. 977, n. 1, p. 97-102, Jul 2003. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788518> >.

WALCZAK, K. et al. Kynurenic acid inhibits proliferation and migration of human glioblastoma T98G cells. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 1, p. 130-6, Feb 2014. ISSN 1734-1140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905318> >.

WANG, J. Y. DNA damage and apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 8, n. 11, p. 1047-8, Nov 2001. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687882> >.

WANG, Q. et al. High dose of simvastatin induces hyperlocomotive and anxiolytic-like activities: The association with the up-regulation of NMDA receptor binding in the rat brain. **Exp Neurol**, v. 216, n. 1, p. 132-8, Mar 2009. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100736> >.

WESOŁOWSKI, J. R.; RAJDEV, P.; MUKHERJI, S. K. Temozolomide (Temodar). **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 31, n. 8, p. 1383-4, Sep 2010. ISSN 1936-959X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538821> >.

WESTPHAL, M.; LAMSZUS, K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 9, p. 495-508, Sep 2011. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811295> >.

WU, H. et al. Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis. **Neurosurgery**, v. 65, n. 6, p. 1087-96; discussion 1096-7, Dec 2009. ISSN 1524-4040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934968> >.

YANAE, M. et al. Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. **J Exp Clin Cancer Res**, v.

30, p. 74, 2011. ISSN 1756-9966. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21831290> >.

YANG, P. M. et al. Inhibition of autophagy enhances anticancer effects of atorvastatin in digestive malignancies. **Cancer Res**, v. 70, n. 19, p. 7699-709, Oct 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876807> >.

YANG, S. C. et al. Apoptosis induced by nucleosides in the human hepatoma HepG2. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 40, p. 6381-4, Oct 2005. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16419169> >.

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, n. 24, p. 10767-77, Dec 1999. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594060> >.

YE, Z. C.; SONTHEIMER, H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. **Cancer Res**, v. 59, n. 17, p. 4383-91, Sep 1999. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485487> >.

YONGJUN, Y. et al. Atorvastatin suppresses glioma invasion and migration by reducing microglial MT1-MMP expression. **J Neuroimmunol**, v. 260, n. 1-2, p. 1-8, Jul 2013. ISSN 1872-8421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707077> >.

YOO, B. K. et al. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): A multifunctional regulator of normal and abnormal physiology. **Pharmacol Ther**, v. 130, n. 1, p. 1-8, Apr 2011. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21256156> >.

YOSHIDA, M. Potential role of statins in inflammation and atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, v. 10, n. 3, p. 140-4, 2003. ISSN 1340-3478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14564082> >.

YOSHINO, A. et al. Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. **Int J Oncol**, v. 36, n. 6, p. 1367-77, Jun 2010. ISSN 1791-2423. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428759>>.

ZACCO, A. et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. **J Neurosci**, v. 23, n. 35, p. 11104-11, Dec 2003. ISSN 1529-2401. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657168>>.

ZHANG, Z. S. et al. Dihydroartemisinin increases temozolomide efficacy in glioma cells by inducing autophagy. **Oncol Lett**, v. 10, n. 1, p. 379-383, Jul 2015. ISSN 1792-1074. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26171034>>.

ZOU, Y. et al. Temozolomide induces autophagy via ATM-AMPK-ULK1 pathways in glioma. **Mol Med Rep**, v. 10, n. 1, p. 411-6, Jul 2014. ISSN 1791-3004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24737504>>.