

RENATA NASCIMENTO GOMES

**ANÁLISE DO PERFIL DOS PROSTANOÏDES E DO SEU PAPEL NO CONTROLE
DA MIGRAÇÃO CELULAR EM GLIOBLASTOMA**

Tese apresentada ao Programa de
Pós - Graduação em Biologia
Celular e Tecidual do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2016

RENATA NASCIMENTO GOMES

**ANÁLISE DO PERFIL DOS PROSTANOÏDES E DO SEU PAPEL NO CONTROLE
DA MIGRAÇÃO CELULAR EM GIOBLASTOMA**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientador: Profa. Dra. Alison Colquhoun.

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Gomes, Renata Nascimento.

Análise do perfil dos prostanoïdes e do seu papel no controle da
migração celular em Glioblastoma. / Renata Nascimento Gomes. – São
Paulo, 2016.

Orientador: Alison Colquhoun.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento.
Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa:
Metabolismo e câncer.

Versão do título para o inglês: Analysis of the prostanoïds profile and
its role in control cell migration in glioblastoma.

1. Câncer 2. Glioma 3. Prostanoide 4. Prostaglandina E2 5.
Migração 6. Receptores I. Colquhoun, Alison II. Universidade de São
Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB090/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renata Nascimento Gomes.

Título da Tese: Análise do perfil dos prostanoïdes e do seu papel no controle da migração celular em Glioblastoma.

Orientador(a): Alison Colquhoun.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a / /, considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome: _____

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome: _____

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome: _____

Instituição:

Tecendo a Manhã

Um galo sozinho não tece uma manhã:
ele precisará sempre de outros galos.
De um que apanhe esse grito que ele
e o lance a outro; de um outro galo
que apanhe o grito de um galo antes
e o lance a outro; e de outros galos
que com muitos outros galos se cruzem
os fios de sol de seus gritos de galo,
para que a manhã, desde uma teia tênue,
se vá tecendo, entre todos os galos.
E se encorpando em tela, entre todos,
se erguendo tenda, onde entrem todos,
se entretendendo para todos, no toldo
(a manhã) que plana livre de armação.
A manhã, toldo de um tecido tão aéreo
que, tecido, se eleva por si: luz balão.

(João Cabral de Melo Neto)

Dedicatória

Aos meus pais, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram aos filhos a oportunidade de realizar sonhos e conquistas. Além de sempre ensinarem a dar valor aos estudos e a ter perseverança em tempos difíceis

A minha irmã e ao meu irmão, por todo incentivo e apoio, amor e dedicação.

Ao meu sobrinho Enzo, por simplesmente sorrir ao me ver.

Ao Alex, meu artista particular, pelo companheirismo, estímulo e amor, fundamentais para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Nestes anos de doutorado procurei aproveitar ao máximo todos os momentos, pois estava vivendo uma experiência única. Isso fez com que estes anos fossem intensos e de grandes mudanças, pessoais e profissionais.

Por isso agradeço a uma das maiores responsáveis, a minha querida orientadora/amiga Profa. Dra. Alison Colquhoun, pela oportunidade de me receber e por compartilhar seus conhecimentos que sem dúvida, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. O convívio dia a dia e extra laboratório nestes quase 10 anos me proporcionaram oportunidades, experiências e aprendizados únicos que eu levarei pelo resto da minha vida.

MUITO OBRIGADA chefa pela grande oportunidade. Sou eternamente grata!

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos antigos e novos de Laboratório Metabolismo da Célula Tumoral: Marcel, Juliano, Andrew, Pollyana, Marina, Fabio (Forasteiro), Matthew e Suzana.

A minha técnica “legitima e de direito” Marloquinha, que sempre contagia a todos com seu lindo sorriso e seu jeito meigo de ser. Obrigado pela colaboração profissional, pessoal por todo o seu carinho e amizade nesses anos. Amo você.

As minhas técnicas “postiças” prediletas Emilinha e Gabriela por sempre estarem dispostas a ajudar no que fosse necessário.

Aos meus eternos e amados ICs Janaina e Luquinhas (minha alma gêmea tratada com H₆OC₂), por nunca me deixarem acomodada.

A Tatinha, pelo carinho incentivo, conversas e as lembranças dos maravilhosos anos 80.

A Fernandinha, minha dupla, que nestes anos tornou minha vida mais leve, divertida e menos séria. Foram muitos experimentos, congressos, viagens e cumplicidades.

Ao Felipe (minha metade científica torta), pela sua amizade, fidelidade, conversas, devaneios e todo apoio nesta longa caminhada. Pessoa igual a você não há, faça chuva ou faça sol, esta sempre disposta a me ajudar. Muitíssimo obrigado Fe.

Aos professores Matés, Márquez, Alonso e a todos da Universidade de Malaga que me acolheram com carinho e me proporcionaram uma experiência profissional e pessoal única e maravilhosa.

Um agradecimento especial a Mercedida, minha cientista furacão, que em um ano de convívio se tornou uma pessoa muitos especiais na minha jornada.

Ao Tio Bauer, pelas conversas, atenção, conselhos, cafés, elogios “infalíveis”, puxões de orelha e, principalmente, pelo exemplo de pessoa e profissional.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular e Tecidual, Dânia, Maria Inês, Eugênia, Estela, Edna, Irene, Gláucia, Patrícia Gama, Sérgio, Ruy, Nathalie, Fábio, Vanessa, Carolina, Fernanda, Zeca, Patricia, Telma, Marilene, Marília e Zé Roberto por de alguma forma terem contribuído com o meu desenvolvimento nestes anos de pós-graduação.

A todos os funcionários do departamento que dividiram de alguma forma suas experiências e sabedoria nessa caminhada. As secretárias do departamento Eloise, Celiana e Ana Lúcia. Em especial a Regina que foi um anjo nestes anos do meu doutorado.

Os meus antigos e novos colegas de pós-graduação pelas experiências, risadas e convivência ao longo desses anos.

Um agradecimento especial a todos os meus amigos que torceram e acreditaram na minha vitória: Lilian Kimura, Flavio, Juliana, Sheila, Daise, Dani.

Ao pessoal da Biblioteca pela total atenção.

E finalmente a CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Leon C. Megginson

RESUMO

Gomes RG. Análise do perfil dos prostanoïdes e do seu papel no controle da migração celular em glioblastoma. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Glioblastoma (GBM; astrocitoma OMS grau IV) é o tumor cerebral mais comum e agressivo em adultos. Apesar dos tratamentos intensivos envolvendo ressecção cirúrgica, quimio e radioterapia, a maioria dos pacientes diagnosticados com GBM tem uma sobrevida média de apenas 1 ano. As dificuldades relacionadas ao sucesso dos tratamentos, em grande parte estão relacionadas à elevada capacidade de migração e invasão das células tumorais de GBM para o tecido cerebral adjacente. Os prostanoïdes (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 e TXA_2) fazem parte de uma família de compostos lipídicos biologicamente ativos derivados do ácido araquidônico (AA) que estão envolvidos em várias funções fisiológicas e patológicas. A produção aumentada desses prostanoïdes, especialmente de PGE_2 , está envolvida com vários processos do desenvolvimento e progressão do câncer, tais como a proliferação, apoptose e angiogênese. PGE_2 através de diferentes vias de sinalização é conhecida por influenciar no processo de migração celular de vários tumores. No entanto, em GBM o papel destes prostanoïdes é pouco compreendido. O objetivo deste estudo foi analisar *in vitro* o perfil de diferentes prostanoïdes nas linhagens de GBM (T98G, A-172, U-138MG, U-251MG e U-87MG), além de verificar o papel dos prostanoïdes e dos seus receptores na migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG. Os resultados demonstraram um perfil de produção dos prostanoïdes da série 2 bem diferente entre as linhagens, além da não detecção dos prostanoïdes da séries 1 e 3. A expressão de COX-1, COX-2, mPGES1, mPGES2, cPGES, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD foi observada pelas técnicas de PCR em tempo real e imunofluorescência. Nos ensaios de migração, observamos um aumento da migração celular nas linhagens U-251MG e U-87MG após a adição dos prostanoïdes exógenos. Nos tratamentos com os antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4 (L161.982) foi observado em ambas as linhagens a diminuição da capacidade de migração das células em relação aos seus respectivos controles. Em conjunto esses resultados, demonstram um papel importante dos prostanoïdes, especialmente PGE_2 , no processo de migração das células de GBM. Sendo este efeito mediado, pelo menos em parte, por uma alteração na resposta celular, seguida da ativação dos receptores EP2 e EP4.

Palavras-Chaves: Glioblastoma. Prostanoïdes. Prostaglandina E₂. Migração. Receptores EP.

ABSTRACT

Gomes RG. Analysis of the profile of prostanoids and their role in the control of cell migration in glioblastoma. [Ph.D Thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Glioblastoma (GBM; astrocytoma grade IV WHO) is the most common and aggressive brain tumour in adults. Despite intensive treatments involving surgical resection, radiotherapy and chemotherapy, most patients diagnosed with GBM have a median survival of only 1 year. The difficulties involved in the success of treatments are largely due to the migratory and invasive capacity of the GBM tumour cells to invade surrounding brain tissue. The prostanoids (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 e TXA_2) are part of a family of biologically active lipids derived from arachidonic acid (AA) that are involved in various physiological and pathological functions. The increased production of these prostanoids, especially PGE_2 , is involved in many developmental processes and cancer progression, such as proliferation, apoptosis and angiogenesis. PGE_2 , through different signaling pathways is known to influence the process of cell migration of various tumours. However, in GBM the role of these prostanoids is poorly understood. The aim of this study was to analyse the *in vitro* profile of different prostanoids in the cell lines of GBM (T98G, A-172, U-138MG, U-251MG and U-87MG), as well as analysing the role of prostanoids and their receptors in the migration of the U-251MG and U-87MG cell lines. The results showed a varied production of series 2 prostanoids among the different cell lines, and a lack of detection of series 1 and 3 prostanoids. The expression of COX-1, COX-2, mPGES1, mPGES2, cPGES, EP2, EP4, PGT and 15-HPGD was observed by real-time PCR and by immunofluorescence. In migration assays treatment with exogenous prostanoids increased the migration of U-251MG and U-87MG cell lines. Treatment with the EP2 receptor antagonist (AH6809) and EP4 receptor antagonist (L161.982) caused a decrease in the migration of both cell lines in comparison with their respective controls. Together these results demonstrate the important role of prostanoids, especially PGE_2 , in the migration process of GBM cells. This effect is mediated, at least in part, by a change in cellular response, following the activation of the EP2 and EP4 receptors.

Keywords: Glioblastoma. Prostanoid. Prostaglandin E₂. Migration. EP Receptors

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 15-PGDH - 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase
15d-PGJ₂ - ciclopentenona prostaglandina 15-desoxi-12,14-Δ PGJ₂
AA - Ácido Araquidônico
AINEs - Antiinflamatórios não esteroides
AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico
APCMin/+: Gene APC para neoplasia intestinal múltipla
COX - Ciclooxygenase
cPGES - Prostaglandina sintase
DHGLA - Ácido Dihomo-Gama-Linolênico
DHA - Ácido docosahexaenoíco
DEPC - Dimetil pirocarbonato
DMSO - Dimetilsulfóxido
EGFR - Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
EPA - ácido eicosapentaenoíco
EPs - Receptores de PGE₂
ERK - Quinase Regulada por Sinal Extracelular
PLA₂ - Fosfolipase A₂
GBM - Glioblastoma
GLA - Ácido gama-Linolênico
PGG₂ - Hidroperóxido prostaglandina G₂
PGH₂ - Hidroxiperóxido prostaglandina H₂
IBU – Ibuprofeno
IP3 – Fosfatidil inositol 3
MAPK - Proteína Quinase Ativado por Mitógeno
MDR - Proteínas de resistência a múltiplas drogas
MEC - Matriz Extracelular
MMP - Metaloproteínase matriz
mRNA– RNA mensageiro
OMS - Organização Mundial da Saúde
PDGFA- Fator de crescimento derivado de plaquetas tipo A
PDGFR - receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas tipo A
PG – Prostaglandina

PGD₂ - Prostaglandina D₂

PGE₁ - Prostaglandina do tipo E1

PGE₂ - Propstaglandina E2

mPGES1 - Prostaglandina sintase 1

mPGES2 - Prostaglandina sintase 2

PGT - Proteína transportadora de prostaglandina

PPAR - receptor ativado por proliferador de peroxissomo

PKC – Proteína quinase C

RNA - Ácido Ribonucléico

SDS - dodecilsulfato de sódio

SNC - Sistema Nervoso Central

TBS - Tampão Tris Salina

TCGA - Atlas Genômico do Câncer

OMS - Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias moleculares envolvidas na formação do glioblastoma.....	22
Figura 2 - Biossíntese dos prostanoïdes	28
Figura 3 - Influência de PGE ₂ no câncer.	29
Figura 4 - Mecanismos de transdução de sinal dos receptores EPs de PGE ₂	35
Figura 5 - Via de degradação de PGE ₂	36
Figura 6 – Representação esquemática de uma célula de GBM migrando	38
Figura 7 - Padronizações qRTPCR	61
Figura 8 - Expressão relativa dos genes COX-1, COX-2, mPGES1, mPGES2, cPGES, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD nas linhagens U-251MG e U-87MG.	56
Figura 9 - Imunofluorescência das células U-251MG	57
Figura 10 - Imunofluorescência das células U-87MG	58
Figura 11 - Cromatograma completa dos 21 prostanoïdes monitorados.....	60
Figura 12 - Gráficos das análises dos dados de LC\ESI-MS/MS.....	64
Figura 13 - Curva de concentração dos prostanoïdes em U-251MG e U-87MG.....	66
Figura 14 - Curva de concentração dos antagonistas em U-251MG e U-87MG.	67
Figura 15 - Efeito dos prostanoïdes (PGE ₁ , PGE ₂ , PGD ₁ , PGD ₂ , PGF _{1α} , PGF _{2α}) na migração das células U-251MG.	69
Figura 16 - Efeito dos prostanoïdes (PGE ₁ , PGE ₂ , PGD ₁ , PGD ₂ , PGF _{1α} , PGF _{2α}) na migração das células U-87 MG	70
Figura 17 - Efeito dos antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4(L161982) na migração da célula U-251MG.	73
Figura 18 - Efeito dos antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4(L161982) na migração da célula U-87MG	74
Figura 19 - Efeito dos antagonistas dos receptores (EP2 e EP4) e PGE ₂ na migração das células U-251MG	76
Figura 20 - Efeito dos antagonistas dos receptores (EP2 e EP4) e PGE ₂ na migração das células U-87MG	77
Figura 21 - Efeito de PGE ₂ e os antagonistas dos receptores (EP2 e EP4) na migração das células U-251MG e U-87MG.....	78
Figura 22 - Representação da possível ação de PGE ₂ em GBM	96

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Classificação da OMS de tumores cerebrais gliais	20
Esquema 2 - Metabolismo dos ácidos graxos essenciais.	22

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Mecanismos de sinalização dos prostanoïdes.....	27
Tabela 2 - Diferenças entre COX-1 e COX-2.	31
Tabela 3 - Sequências dos primers utilizados em reações de RT-PCR	44
Tabela 4 - Temperaturas utilizadas para qRT-PCR.....	45
Tabela 5 – Concentrações de primers utilizadas nas reações de qRT-PCR	46
Tabela 6 - Anticorpos usados em imunofluorescência	49
Tabela 7 - Lista de <i>m/z</i> e transições monitoradas para cada prostanoide analisado.....	61
Tabela 8 – Relações estatísticas dos prostanoïdes na migração	71
Tabela 9 - Resultados dos tratamentos realizados com os prostanoïdes na migração.....	71
Tabela 10 - Resultados dos tratamentos realizados com antagonistas na migração.....	78
Tabela 11 - Tratamentos realizados com antagonistas na migração	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Tumores do SNC.....	19
1.2 Gliomas.....	19
1.3 Glioblastoma (GBM)	21
1.4 Prostanoides	23
1.5 Prostaglandina E₂ (PGE₂) e o câncer	28
1.4.1 Ciclooxygenases (COX).....	30
1.4.2 Sintases (mPGES1, mPGES2 e cPGES)	33
1.4.3 Receptores de PGE₂.....	34
1.4.4 PGT e 15-PGDH.....	36
1.5 Migração Celular.....	37
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Cultura celular	41
3.2 Análise da expressão gênica através do qRT-PCR.....	41
3.2.1 Extração do RNA.....	42
3.2.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)	42
3.2.3 Desenho dos primers	43
3.2.4 Determinação de temperatura dos primers.....	44
3.2.5 Determinação da concentração dos primers	45
3.2.6 Determinação da eficiência dos primers.....	46
3.2.7 Reação de qRT-PCR.....	47
3.2.8 Análise de dados do qRT-PCR	47
3.3 Imunofluorescência	48
3.4 LC/ESI-MS/MS.....	49
3.5 Migração Celular	50
3.5.1 Padronizações das concentrações dos prostanoides e dos antagonistas EP2 e EP4.....	50
3.5.2 Ensaio de migração	51
3.6 Análises estatísticas	52
4 RESULTADOS	53
4.1 Otimização das reações de qRTPCR	53
4.2 Análise da expressão gênica nas linhagens U-251MG e U-87MG.....	55

4.3 Imunofluorescência nas linhagens U-251MG e U-87MG	56
4.4 LC/ESI-MS/MS nas linhagens de GBM	59
4.5 Migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG	65
4.5.1 Padronizações das concentrações dos prostanoïdes e dos antagonistas EP2 e EP4.....	65
4.5.2 Migração celular de U-251MG e U-87MG tratadas com prostanoïdes.....	68
4.5.3 Migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG tratadas com os antagonistas de EP2 (AH6809) e EP4 (L161.982).....	72
4.5.4 Migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG tratadas com os antagonistas de EP2 (AH6809) e EP4 (L161.982) e PGE₂ exógena.	75
5 DISCUSSÃO	79
5.1 Análise da expressão gênica e proteica	79
5.2 LC/ESI-MS/MS nas linhagens de GBM	85
5.3 Migração celular nas linhagens U-251MG e U-87MG tratadas com prostanoïdes.....	91
5.4 Influências dos receptores EP2 e EP4 na migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG	93
6 CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS*	98
ANEXO.....	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores do SNC

O tumor de cérebro é um termo geral que inclui vários tipos de tumores benignos e malignos, classificados com base na histopatologia em: tumores do tecido neuroepitelial (glioma); tumores das meninges incluindo meningioma e hemangioblastoma; tumores de células germinativas e tumores da região selar, incluindo tumores da pituitária e craniofaringioma (Fisher et al., 2007). Os tumores cerebrais são um grupo bastante heterogêneo, possuindo grandes variações quanto a sua origem, características morfológicas, alterações genéticas, crescimento, capacidade de invasão, diferentes respostas ao tratamento e tendência a reincidente (Louis et al., 2007; Ostrom et al., 2014).

Embora a incidência desses tumores seja relativamente baixa, cerca de 2% de todas as neoplasias malignas, nas últimas décadas têm se tornado importante no cenário epidemiológico mundial devido ao aumento da sua incidência e mortalidade (Huttner, 2012).

No Brasil, a estimativa de incidência de tumores do SNC foi de 5,07 casos novos a cada 100 mil homens e 4,05 a cada 100 mil mulheres (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2014). Dentre todos os tumores cerebrais os mais frequentes são os tumores originários das células da glia, genericamente conhecidos com glioma.

1.2 Gliomas

Glioma é um dos tipos de tumores primários mais comum do Sistema Nervoso Central (SNC), derivados das células gliais. Estes tumores são responsáveis por aproximadamente 30% de todas as neoplasias do SNC (Adamson et al., 2011).

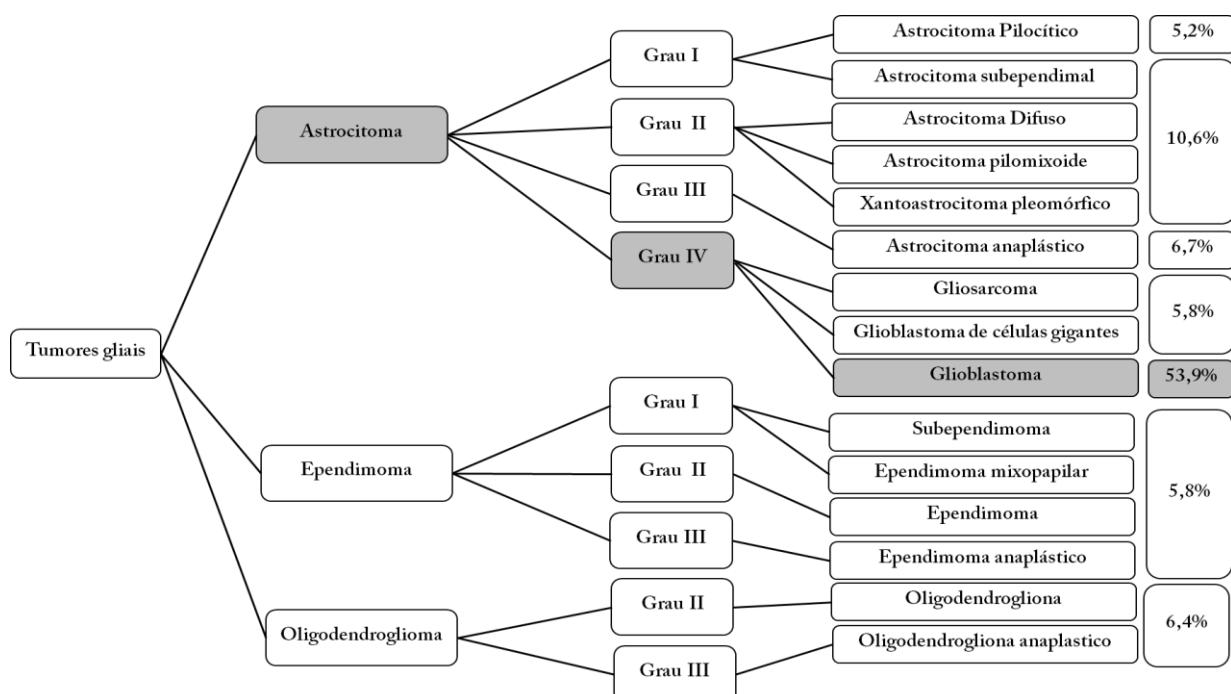
Os gliomas são classificados de acordo com as características histológicas em três grupos principais: astrocitomas, (derivados de astrócitos ou dos seus precursores), oligodendrogliomas (derivados de oligodendrócitos ou dos seus precursores) e ependimomas (derivado das células ependimais ou dos seus precursores) (Gladson et al., 2010; Louis et al., 2007) (esquema 1). Dentre as neoplasias classificadas como gliomas, o grupo dos tumores derivados dos astrócitos, os astrocitomas, constituem o principal

tipo histológico entre os tumores primários do SNC, perfazendo aproximadamente 70% dos casos.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) os astrocitomas são classificados em quatro graus de malignidade, que se baseiam na presença de indicadores como hiperproliferação endotelial, mitoses, necrose, atípia nuclear e presença de células atípicas.

Os tumores grau I, conhecidos como astrocitomas pilocíticos, possuem lesões com baixo potencial proliferativo e com grandes chances de cura após o tratamento. Os astrocitomas difusos são classificados como grau II, por crescerem de forma lenta, podendo ou não invadir o tecido cerebral normal adjacente.

Os tumores grau III são os astrocitomas anaplásicos, possuem alta taxa de proliferação e invasividade ao tecido normal, além de alta taxa de recorrência. Por fim, o tumor grau IV denominado glioblastoma, corresponde à neoplasia com maior taxa de atividade mitótica, com tendência para a necrose e/ou proliferação microvascular, podendo haver infiltração dos tecidos circundantes e disseminação crânio-espinhal (Crocetti et al., 2012; Loius et al., 2016; Persano et al., 2013).



Esquema 1 - Classificação da OMS de tumores cerebrais gliais. Baseado em Louis et al., 2016.

1.3 Glioblastoma (GBM)

Glioblastoma é o tumor cerebral primário mais frequente em adultos e crianças, representando aproximadamente de 15-20% de todas as neoplasias intracranianas e 50% entre os astrocitomas. Sua frequência é de 5 casos por 100 000 pessoas (Crocetti et al., 2012; Dolecek et al., 2012; McCarthy, Kruchko, 2005).

O termo glioblastoma multiforme foi usado pela primeira vez em 1925 por Globus e Straus como um substituto para a categoria conhecida como multiforme spongioblastoma (Shabason, 2011).

Histologicamente, esse tipo de tumor é caracterizado por alta celularidade, atipia nuclear, polimorfismo celular, intensa atividade mitótica, presença de necrose com células em paliçadas e proliferação microvascular, sinais típicos de um câncer agressivo (Loius et al., 2016). Anatomicamente, o GBM ocorre preferencialmente na substância branca subcortical dos hemisférios cerebrais. As regiões mais comumente acometidas são: lobo temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%) e occipital (16%) podendo se expandir para o tecido cortical adjacente e para o tronco cerebral (Ewelt et al., 2011; Koul et al., 2012; Larjavaara et al 2007).

O potencial metastático do GBM é extremamente reduzido, porém quando presentes podem ser encontrados no baço, pleura, pulmões, nódulos linfáticos, fígado, ossos, pâncreas e intestino delgado. Acredita-se que o baixo potencial metastático do GBM é em grande parte resultado da barreira criada pelo cérebro e meninges (Mujic et al., 2006, Robert, Wastie, 2008; Urbańska et al., 2014).

Baseado em sua origem e características clínicas, os GBMs podem ainda ser subdivididos em primário e secundário (figura 1). Os glioblastomas primários (ou *de novo*) possuem um crescimento acelerado com curta história clínica (inferior a 3 meses) sem evidência de uma lesão pré-existente. Correspondem à maioria dos casos de GBM (cerca de 90% dos casos) e acometem, principalmente, pacientes mais idosos, com idade aproximada de 60 anos. Além disso, molecularmente, eles apresentam mutações em receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR), perda de heterozigosidade (LOH) da região 10q, deleções nos gene *p16* ou *p14*, mutações no gene *PTEN* e no *TP53* (Ohgaki, Kleihues, 2007, 2013).

Em contrapartida, os glioblastomas secundários desenvolvem-se através da progressão de um glioma de menor grau, como o astrocitoma difuso (grau II) ou astrocitoma anaplásico (grau III), sendo mais comum em pacientes mais jovens

(aproximadamente 45 anos). Eles se caracterizam principalmente com maior frequência de mutações no TP53, LOH do cromossomo 17p e alta expressão do fator de crescimento derivado de plaquetas tipo A (PDGFA) e o receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas tipo A (PDGFR α) (figura 1) (Ohgaki, Kleihues, 2007, 2013).

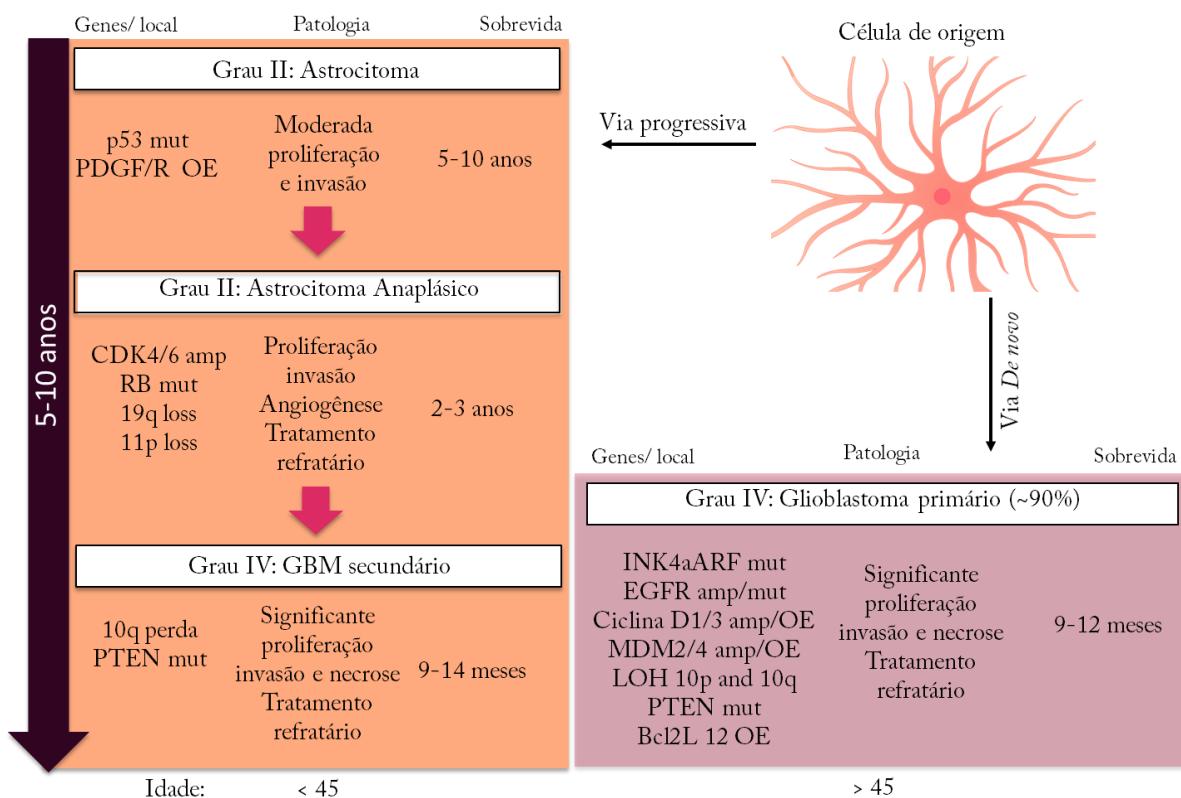


Figura 1 - Vias moleculares envolvidas na formação do glioblastoma. Adaptado de Ohgaki e Kleihues (2007).

Por causa da natureza complexa e altamente heterogênea destes tumores, recentemente inúmeros estudos utilizando os dados do TCGA (Atlas Genômico do Câncer) identificaram alterações genômicas que permitiu a subdivisão dos GBM em quatro subtipos distintos (Robertson et al., 2011; Verhaak et al., 2010). Neste sentido, de acordo com a expressão gênica de um conjunto de mutações relacionadas ao desenvolvimento deste tumor, o GBM foi caracterizado como proneural, neural, clássico e mesenquimal (Bleeker et al., 2012; Phillips et al., 2006).

Atualmente o protocolo mais indicado para o tratamento do GBM é a ressecção cirúrgica, seguida de quimioterapia e radioterapia (Lanzetta, Minniti, 2010). Entretanto, a grande capacidade de migrar e invadir das células neoplásicas de GBM, junto com a falta de delimitação anatômica torna difícil o sucesso da ressecção cirúrgica. Além do

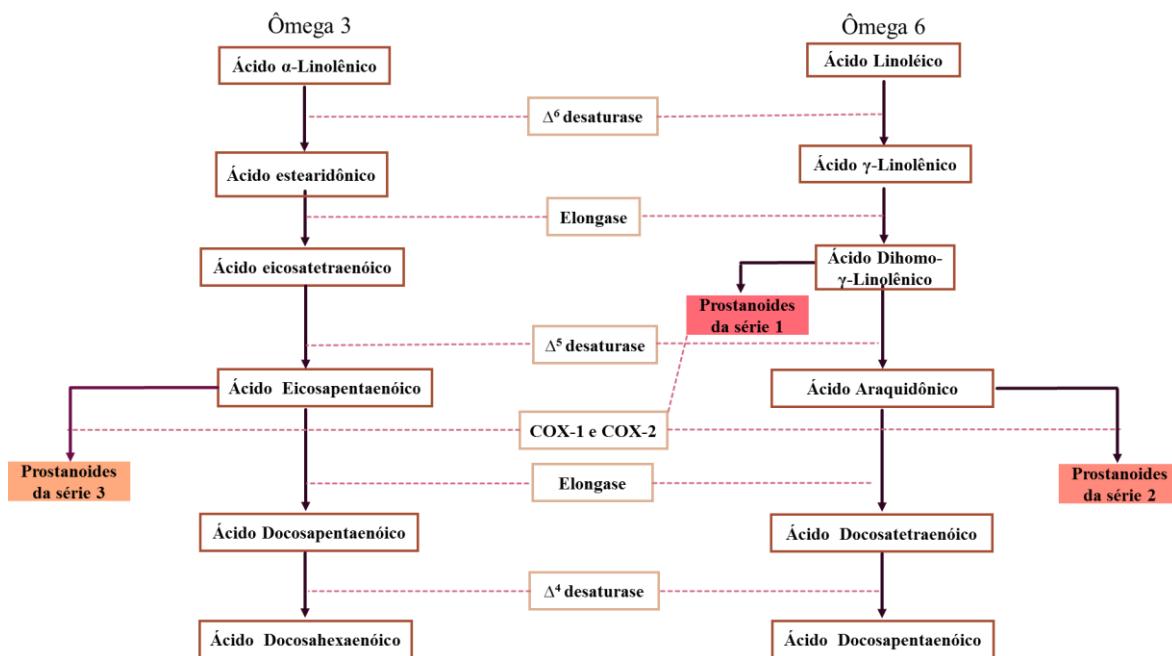
mais, a presença da barreira hematoencefálica em conjunto com a heterogeneidade celular e genética restringem a distribuição das drogas ao cérebro e limitam também a eficácia dos quimioterápicos. Por isso, a sobrevida média para um paciente com GBM a partir do diagnóstico é de aproximadamente 14,6 meses (Alifieris, Trafalis, 2015; Chang et al., 2007; Simpson et al., 1993).

Desta forma, o tratamento de GBM continua sendo um grande desafio devido à baixa eficácia da terapêutica disponível. Assim, é necessária uma busca mais efetiva de marcadores de prognóstico e de novos alvos terapêuticos que possam melhorar a sobrevida de pacientes portadores de GBM.

1.4 Prostanoides

Prostanoides é o termo usado para denominar uma família de compostos lipídicos ativos contendo 20 carbonos, que incluem as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano. Estes compostos lipídios são sintetizados a partir dos ácidos graxos poliinsaturados: ácido dihomô-gama-linolênico (DGLA; precursor dos prostanoides da série 1), ácido araquidonico (AA; precursor dos prostanoides da série 2) e ácido 5,8,11,14,17- eicosapentaenóico (EPA; precursor dos prostanoides da série 3). Entre estes precursores, o AA é o mais importante e predominante nos seres humanos (Bos et al., 2004; von Dorp et al., 1964) (esquema 2).

As prostaglandinas (PGs) foram observadas pela primeira vez por Kurzrok e Lieb, em 1930, no fluido seminal humano. Esta observação foi confirmada e desenvolvida por von Euler (1935) e vinte anos depois Bergström e Sjövall (1957), purificaram com sucesso as primeiras PGs, denominadas PGE₁ e PGF_{1α}. Na década de 70, ficou claro que as prostaglandinas tinham capacidade de desencadear uma diversidade de ações, porém os mecanismos e os locais de atuação das mesmas não eram conhecidos. Nos anos seguintes com a identificação dos receptores ficou mais fácil o entendimento de ação das prostaglandinas, tornando essa área atrativa e importante (Gryglewski, 2008; Samuelsson, 1976).



Esquema 2 – Metabolismo dos ácidos graxos essenciais.

Os prostanoïdes são formados pela maioria das células no corpo e atuam como mediadores lipídicos autócrinos e parácrinos. Eles não são armazenados nas células, mas são sintetizados em resposta a algum estímulo fisiológico, patológico ou farmacológico. A quantidade e o tipo de prostaglandina produzida dependem da maquinaria enzimática expressa no tipo de celular (Narumiya et al., 1999; Tootle, 2013).

A produção dos prostanoïdes ocorre mediante de uma complexa cascata enzimática que tem início com ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) que por hidrolise libera o AA da membrana celular (Figura 2).

Uma vez que o AA é liberado, ele é modificado pela ação das enzimas ciclooxygenases (COX-1 e COX-2). As COXs são enzimas bifuncionais que possuem duas atividades enzimáticas que ocorrem em dois sítios catalíticos distintos.

- Atividade de ciclooxygenase: catalisa a oxidação e ciclização do AA até hidroperóxido prostaglandina G₂ (PGG₂).
- Atividade de peroxidase: catalisa a peroxidação do hidroperóxido prostaglandina G₂ (PGG₂) até hidroxiperóxido prostaglandina H₂ (PGH₂) (Simmons et al., 2004)

Sintases específicas catalisam a conversão da instável PGH₂ às distintas PGs. Para conversão da prostaglandina E₂ são conhecidas três sintases, duas isoformas

microssomais (mPGES1 e mPGES2) e uma citosólica (cPGES). Todas as sintases de PGE₂ estão associadas a ambas as COXs, entretanto apresentam maior afinidade por COX-2 (Murakami, Kudo, 2004).

Atualmente foram identificadas duas sintases de PGD₂ distintas: enzima L-PGDS (lipocaina) e H-PGDS (hematopoética). Ambas possuem a capacidade de converter PGH₂ em PGD₂ (Arima, Fukuda, 2011).

PGD₂ pode ainda sofrer reacções de desidratação/isomerização para formar o ciclopentanona prostaglandina 15-desoxi-12,14-Δ PGJ₂ (15d-PGJ₂). Esta ciclopentanona difere das outras prostaglandinas por não possuir uma prostaglandina sintase específica nem um receptor. Em vez disso, 15d-PGJ₂ atua através dos receptores de PGD₂ (DP1 e DP2) e através da interação com o receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ (PPARγ) (Scher, Pillinger, 2005).

A sintase PGF (PGFS) converte PGH₂ em PGF_{2α}. Porém, outras PGs podem servir de substrato para a síntese de PGF_{2α}. Por exemplo, a PGD₂ pode ser convertida pela AKR1B1 ao metabólito 9α,11βPGF₂ e a PGE₂ ser transformada pela enzima 9-ceto-PGE₂ redutase (9K-PGR) em PGF_{2α} (Smith et al., 2000, 2011).

No caso da PGI₂ e TXA₂ as sintases responsáveis pela conversão são: prostaciclina sintase (PGIS), e TXA sintase (TXS), respectivamente (Smith et al., 2000).

Após serem sintetizados, os prostanoïdes podem atravessar a membrana por difusão simples ou podem ser transportados para o meio extracelular através de uma família de proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR) (Reid et al., 2003). No meio extracelular, os prostanoïdes vão se ligar aos seus receptores específicos para ativar uma multiplicidade de vias celulares importantes (Kochel, Fulton, 2015). Existem nove diferentes tipos de receptores para os prostanoïdes, denominados: DP1 e DP2 receptores de PGD₂, EP1, EP2, EP3 e EP4 receptores de PGE₂, FP receptor de PGF_{2α}, IP receptor de e PGI₂, e TP receptor de TXA₂ (Narumiya et al., 1999; Narumiya, FitzGerald, 2001; Tsuboi et al., 2002).

De maneira bastante simples, os receptores dos prostanoïdes podem ser agrupados em três grupos, baseado no tipo de proteína G à qual são acoplados, e consequentemente em função das respostas celulares evocadas.

Na primeira categoria estão os receptores relacionados com atividade relaxante, IP, EP2, EP4 e DP, os quais geralmente estão acoplados a proteína Gs (estimulatória) e sua ativação estimula a produção de AMPc pela adenilato ciclase (AC).

A segunda categoria é representada pelos receptores com atividade constritora como o EP1, FP e TP, os quais estão acoplados a proteína Gq, mediando o aumento dos níveis intracelulares de Ca⁺².

O último grupo é representado unicamente pelo receptor EP3, que está acoplado a proteína Gi (inibitória), sua ativação inibe a AC, reduzindo os níveis de AMPc. É importante ressaltar que apesar da especificidade da maioria dos receptores derivados da via da COX, o receptor TP (do TXA₂) também pode ser estimulado pelos prostanoïdes PGE₂, PGI₂ e PGF_{2α} (Bos et al., 2004; Coleman et al., 1994).

Embora a maioria das ligações dos prostanoïdes ocorra com os receptores da superfície celular, em alguns casos, no entanto, certas prostaglandinas podem se ligar a receptores nucleares. Entre eles, destacam-se os receptores nucleares pertencentes a uma família de receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPARs), que regulam o metabolismo lipídico, a diferenciação e proliferação celular (Wang et al., 2007).

Os níveis intracelulares dos prostanoïdes, não são controlados apenas pela sua síntese, mas também pelo seu processo de degradação enzimática. A degradação tem início com o transporte dos prostanoïdes do meio extracelular para o meio intracelular pela proteína transportadora de prostaglandina (PGT), em seguida há inativação dos prostanoïdes, pela ação da 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (15-PGDH) (Schuster, 2002; Tai, Tong, 2007).

Tabela 1 – Mecanismos de sinalização dos prostanoïdes.
Baseado Ricciotti e FitzGerald, 2011.

Prostanoide	Receptores	Mecanismos e sinalização
PGE₂	EP1	Acoplado a Gq Aumento de IP3 Aumento de Ca ²⁺
	EP2	Acoplado a Gs Aumento de cAMP
	EP3	Acoplado a Gi Diminui AMPc Aumento de Ca ²⁺
	EP4	Acoplado a Gs Aumento de cAMP
PGD₂	DP1	Acoplado Gs Aumento de cAMP
	DP2 (CRTH2)	Acoplado a Gi Diminui AMPc Aumento de Ca ²⁺
PGF_{2α}	FPA	Acoplado a Gq Ativa PLC Aumenta AMPc
	FPB	Acoplado a Gq Ativa PLC Aumenta AMPc
PGI₂	IP	Acoplado a Gs Aumenta AMPc
	PPAR β/γ	Modulam indução de genes
TXA₂	TP α	Acoplado a Gq Ativa PLC Diminui AMPc Aumento de Ca ²⁺
	TP β	Acoplado a Gq Ativa PLC Diminui AMPc Aumento de Ca ²⁺

Este processo dá origem aos metabólitos com atividades biológicas muito reduzidas, que são 13, 14-dihidro-15 ceto PGF_{2α}, para PGF_{2α} e 13, 14-dihidro-15 ceto PGE₂, no caso de PGE₂. PGD₂ será metabolizada em PGs da série J (PGJ₂, Delta 12 PGJ₂, 15-deoxi-delta12,14PGJ₂) ou F (9 α 11 β PGF₂; isômero de PGF_{2α}). O TXA₂ e a PGI₂ são instáveis e são degradadas em seus metabólitos inativos TXB₂ e 6-ceto-PGF_{1α}, respectivamente. (Holla et al., 2008; Korbecki et al., 2014; Wang, DuBois, 2007).

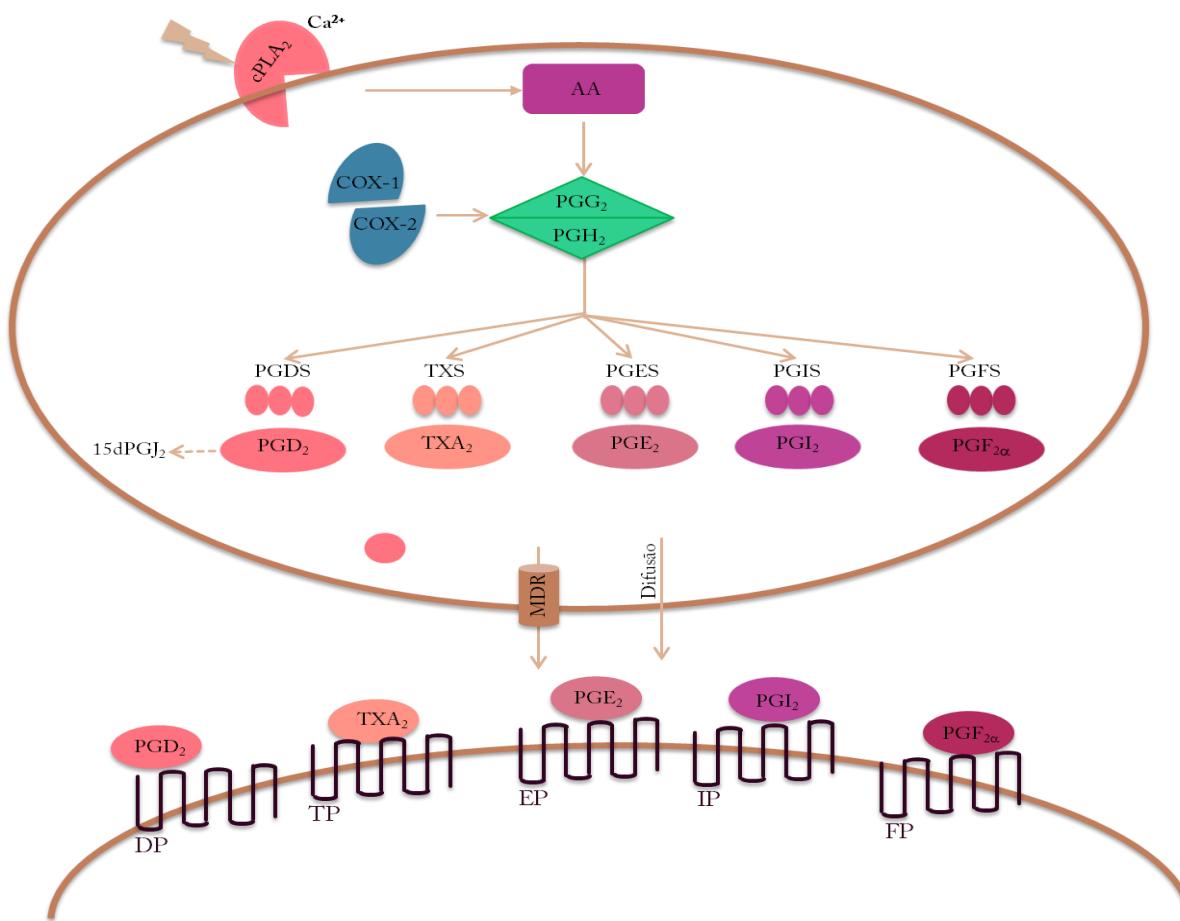


Figura 2 - Biossíntese dos prostanoïdes.

1.5 Prostaglandina E₂ (PGE₂) e o câncer

Entre os prostanoïdes, PGE₂ é a prostaglandina mais abundante do organismo, sendo produzida por várias células, como os fibroblastos, leucócitos e células renais. Este mediador lipídico é o principal membro da família das prostaglandinas, pois desempenha um importante papel em diversos sistemas fisiológicos, como o sistema gastrointestinal, renal, cardiovascular e reprodutor, além de ser o principal mediador da inflamação (Greenhough et al., 2009; Wang, Dubois, 2010).

Por outro lado, PGE₂ também está envolvido em ações patológicas, como no câncer, promovendo o crescimento e sobrevivência celular do tumor através de vários mecanismos, incluindo aumento da proliferação, inibição da apoptose, aumento da migração e invasão, angiogênese e inflamação crônica (Figura 3).(Wang, DuBois, 2006).

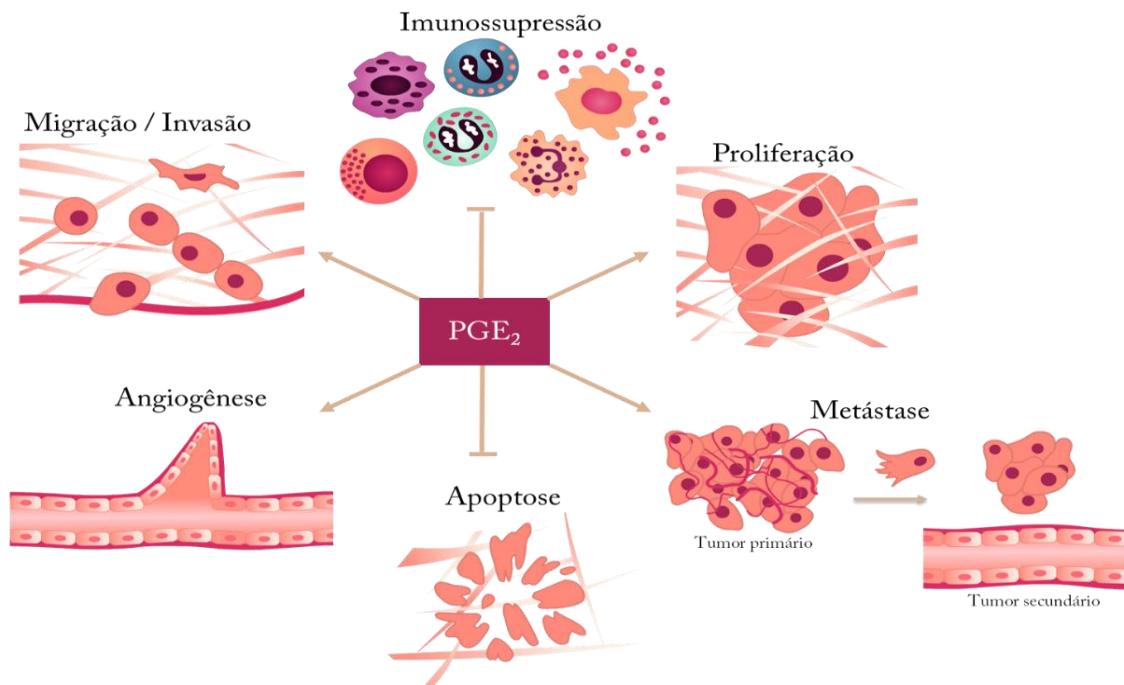


Figura 3 - Influência de PGE₂ no câncer.

Níveis elevados de PGE₂ são encontrados em várias neoplasias humanas, incluindo cólon, pulmão, mama e câncer de cabeça e pescoço, e por muitas vezes associadas a um mau prognóstico (Wang, DuBois, 2010).

PGE₂ estimula a proliferação celular, aumenta a sobrevivência celular, e inibe a apoptose através da ativação de vias pró-sobrevivência, tais como a PI3K, Erk, EGFR, Bcl-2 e NF-κB (Wang, Dubois, 2010).

Em relação à migração e invasão, PGE₂ estimula a regulação positiva do receptor CCR7, ativação de Rap, e de EGFR (Buchanan et al., 2006; Pan et al., 2008; Sheng et al., 2001; Wu et al., 2011). PGE₂ também aumenta a adesão através da expressão elevada da integrina α3β1, além de aumentar a produção da MMP2 (Ito et al., 2004; Mitchell et al., 2010). Quanto à angiogênese, PGE₂ induz a expressão de Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Chang et al., 2004; Sonoshita et al., 2001). Além disso, PGE₂ é um mediador chave no *crosstalk* entre as células tumorais e as células estromais no microambiente tumoral. PGE₂ também contribui para a criação de um tumor promovendo a inflamação do microambiente e suprimindo a ativação do sistema imunitário (Wang, Dubois, 2010).

A relevância biológica do aumento da produção de PGE₂ nos tumores ainda não foi totalmente estabelecida. Em relação aos tumores cerebrais poucos trabalhos foram publicados sobre o papel de PGE₂. De acordo com Anagnostopoulos-Schleep et al.,

(1988) PGE₂ é sintetizado e liberado em vários tumores cerebrais, incluindo GBM. Em outro estudo, também foi observado que os tumores cerebrais malignos continham uma alta concentração de PGE₂ e que a remoção cirúrgica reduziu a produção de PGE₂ (Loh et al., 2002).

Recentemente no trabalho Brocard et al., (2015) foi demonstrado que a adição de PGE₂ exógena em culturas primárias de GBM, aumentou a sobrevivência e proliferação das células analisadas.

Chiu et al., (2010) observou que a ativação de PKC por PGE₂ na linhagem U-87MG aumentou a invasão/migração em GBM. Em outro estudo a adição exógena de PGE₂ na linhagem de glioma humano T98G causou significante aumento na proliferação e na migração celular, além de uma diminuição na apoptose (Gomes, Colquhoun, 2012).

Tomados em conjunto, podemos sugerir que PGE₂ desempenha um papel importante no desenvolvimento de GBM.

1.5.1 Ciclooxygenases (COX)

A COX, também conhecida como prostaglandina-endoperóxido sintase (PGHS), é uma enzima chave na conversão de AA em PGs e outros eicosanoides. Atualmente, são conhecidas três isoformas da COX, denominadas como ciclooxigenase-1 (COX-1), ciclooxigenase -2 (COX-2) e ciclooxigenase -3 (COX-3), sendo as duas primeiras as mais estudadas, enquanto que a terceira foi recentemente descoberta (Rouzer, Marnett, 2009; Smith et al., 1996; Zidar et al., 2009).

A COX-1, isolada por Hemler e Lands (1976), é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos normais, sendo necessária nas funções fisiológicas de preservação do fluxo sanguíneo renal, agregação plaquetária, hemostasia, e citoproteção da mucosa gastrointestinal (Appleby et al., 1994).

No SNC, a COX-1 está presente de forma constitutiva em neurônios, astrócitos, células da micróglia e participa da síntese dos prostanoïdes envolvidos com a homeostase (Yagami et al., 2015).

Ao contrário da COX-1, a COX-2 pode ser expressa constitutivamente ou ser induzida em vários tipos celulares desempenhando um importante papel fisiológico e fisiopatológico. A expressão constitutiva dessa isoforma é restrita aos rins, sistema gástrico, áreas do sistema nervoso central bem como tecidos envolvidos na reprodução.

Na maioria dos tecidos normais a expressão da COX-2 é induzida de forma transitória por estímulos pró-inflamatória, fatores de crescimento, citocinas e promotores tumorais (Appleby et al., 1994).

Apesar de serem proteínas semelhantes com aproximadamente 60% de homologia e peso molecular de cerca de 70 kD, a COX-1 e a COX-2 são codificadas por genes distintos localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente. (Smith et al., 1996). Ambas as enzimas estão localizadas na superfície interna do retículo endoplasmático e nas faces interna e externa da membrana nuclear; COX-2, no entanto, está relativamente mais concentrada no envoltório nuclear (Merlie, 1988; Needleman, Isakson, 1997; Vane et al., 1998).

Tabela 2 – Diferenças entre COX-1 e COX-2. Fonte: Baseado em Simmons et al., (2004).

Características	COX-1	COX-2
Peso Molecular	71	71
Número de aminoácidos	576	587
Localização	Membrana plasmática	Membrana plasmática Membrana do retículo endoplasmático Membrana nuclear
Substrato	Ácido araquidônico Dihomo- γ -linoleato	Ácido araquidônico Dihomo- γ -linoleato Ácido eicosapentanóico Ácido linolênico

Recentemente foi sugerida a existência de outra isoforma, que recebeu a designação de COX-3 (Chandrasekharan et al., 2002). Muitos autores acreditam que a COX-3 é uma variante da COX-1 (pois é derivada do mesmo gene), por isso consideram que a denominação mais apropriada seria COX-1b (Dinchuk et al., 2003). Em humanos, ratos e camundongos a expressão desta enzima encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração (Chandrasekharan et al., 2002). Um papel funcional para COX-3 na fisiologia humana e fisiopatologia ainda não foi estabelecida (Shaftel et al., 2003).

Apesar do papel de destaque dado à COX-2, cada vez mais estudos demonstraram que COX-1 também participa no desenvolvimento dos tumores. A expressão aumentada de COX-1 foi demonstrada em câncer de colo do útero, mama, ovário e da vesícula biliar (Allaj et al., 2013; Fürstenberger et al., 2006; Gupta et al., 2003).

Ferrández et al., (2012) usando modelos de animais e amostras de adenomas colorretais humanos constataram que a expressão da COX-2 só estava presente em pólipos com mais de 1 mm, enquanto que a expressão da COX-1 foi observada em pólipos de todos os tamanhos. Esses resultados sugerem que a COX-1 pode desempenhar um papel importante nos estados mais iniciais do câncer, enquanto a COX-2 parece ser essencial no desenvolvimento mais tardio do mesmo.

Os dados publicados a partir de um estudo realizado por Daikoku et al., (2005) em cultura primária de câncer de ovário, mostraram que o uso do inibidor seletivo da COX-1 (SC-560) reduziu a proliferação celular e aumentou a apoptose. Em contraste, o uso do inibidor seletivo da COX-2 (celecoxib), teve pouco efeito sobre o crescimento do tumor. Estudos similares de Li et al., (2009) com o inibidor SC-560, também reduziu a proliferação celular em 21% na linhagem SKOV3 (carcinoma de ovário).

Lee et al., (1995) observaram que os níveis séricos da COX-1 diminuiu em 50% dos pacientes após a cirurgia para remoção do câncer de ovário. Além disso, foi visto que a deficiência de COX-1 em modelo de rato para de câncer pele reduziu em 75% a tumorigênese dos animais. Em animais nocautes para COX-1 a redução da tumorigênese intestinal também foi observada quando comparados com os animais controles (Chulada et al., 2000; Tiano et al., 2002).

Recentemente Wilson et al., (2015) mostraram uma expressão mais elevada da COX-1 em relação a COX-2 em câncer do ovário seroso de alto grau (HGSOC) e outros 10 tipos de tumores.

A expressão elevada das COXs, principalmente COX-2, é frequentemente observada em diferentes tipos de câncer, como pulmão, gástrico, mama, próstata, ovário, esôfago, pâncreas e cabeça e pescoço (Allaj et al., 2013; Cao, Prescott, 2002; Davis et al., 2005; de Groot et al., 2007; Dong et al., 2010; Vaish, Sanyal, 2012). A desregulação da expressão de COX-2 conduz a um aumento na biossíntese PGE₂ e a indução da inibição da apoptose (Yamanaka et al., 2006), aumento do potencial metastático (Kang et al., 2011; Singh et al., 2007), promoção de angiogénesse (Gately, Li, 2004), evasão imune e resistência à imunoterapia do câncer (Liu et al., 2015).

No trabalho realizado por Bing et al., (2015) o uso do inibidor seletivo da COX-2 (Celecoxib) reduziu significativamente o tamanho e o número de adenomas em polipose adenomatosa familiar (FAP).

No estudo realizado por Glover et al., (2011) foi visto por munohistoquímica que a expressão da COX-2, estava aumentada em aproximadamente 42% dos cânceres

de mama analisados. No tumor de NSCLC (carcinoma de pulmão de células não pequenas) a taxa de expressão da proteína COX-2 foi 90% mais elevada do que no tecido normal (Li et al., 2011).

No cérebro, a situação da COX-2 parece ser particularmente complexa uma vez que é constitutivamente expressa sob condições normais e significativamente elevado durante doenças neurodegenerativas e tumorigênese (Castellone et al., 2005; Gupta, DuBois, 2001; Shono et al., 2001; Williams et al, 2000).

Em tumores cerebrais, a correlação entre a expressão aumentada da COX-2 versus o grau de malignidade do tumor tem sido observada (Shono et al, 2001; Hara, Okayasu, 2004). Em um estudo realizado com 60 amostras de GBM, foi visto uma expressão aumentada e homogênea da COX-2 em todas as amostras analisadas (Lalier et al., 2007).

Recentemente no estudo realizado por Oksuz et al., (2016) com a inoculação da linhagem C6 em ratos Wistar demonstraram a presença do mRNA das COX-1, COX-2 e COX-3 no tecido tumoral e nos tecidos normais do cérebro. No tecido tumoral a expressão da COX-3 foi显著mente mais elevada em relação ao tecido cerebral normal, enquanto que a COX-1 e COX-2 não mostraram diferenças entre os dois tecidos.

Devido a estas evidências, tem-se sugerido que a inibição da expressão das COXs provoque um efeito anticancerígeno, suprimindo o desenvolvimento e invasão das neoplasias (Jia-Jun et al., 2012).

1.5.2 Sintases (*mPGES1*, *mPGES2* e *cPGES*)

Nos últimos anos, um esforço significativo tem sido dirigido para o desenvolvimento de outros alvos enzimáticos dentro da via do AA, incluindo as prostaglandinas sintases.

A síntese de PGE₂ ocorre através de três sintases distintas que incluem duas isoformas microssomais, a prostaglandina E sintase-1 microssomal (*mPGES1*) e a prostaglandina E sintase-2 microssomal (*mPGES2*), e uma isoforma citosólica, prostaglandina E sintase citosólica (*cPGES*) (Jakobsson et al., 1999).

A *mPGES1* é uma forma induzível que está acoplada principalmente a COX-2. Tipicamente a expressão de *mPGES1* é mantida em níveis baixos na maioria dos tecidos

normais. Porém, num número limitado de órgãos, tais como pulmão, rim e órgãos reprodutores a expressão da mPGES1 é abundante e constitutiva (Jakobsson et al., 1999; Murakami, Kudo, 2006).

A mPGES2 é uma proteína de membrana associada ao Golgi, expressa constitutivamente em vários tecidos humanos. Ao contrário da mPGES1, a mPGES2 não é induzida por sinais pró-inflamatórios e liga-se a COX-1 e COX-2 para produzir PGE₂ (Murakami et al., 2003).

Já a cPGES é uma proteína citosólica expressa constitutivamente no citosol em vários tecidos e células. Esta sintase participa da produção de PGE₂ ligando-se especificamente com a COX-1 (Tanioka et al., 2000).

Como no caso das COXs, quantidades elevadas das PGES, principalmente da mPGES1, tem sido encontradas em tumores de diferentes tipos, sendo relacionadas com vários processos importantes na tumorigênese (Rådmark, Samuelsson, 2010).

Em GBM a expressão elevada das três sintases foi encontrada em 94 amostras de pacientes, enquanto que na linhagem U87-MG a expressão constitutiva da mPGES1 está associada com o aumento da produção de PGE₂ e com o estímulo de crescimento da linhagem, em comparação com astrócitos primários humanos (Mattila et al., 2009; Payner et al., 2006). A inibição da expressão e da atividade de mPGES1 na mesma linhagem, bloqueou a produção de PGE₂ e diminuiu a sua proliferação. Em outro estudo, a sensibilidade de culturas primárias de GBM a apoptose foi aumentada pela expressão aumentada de mPGES1, ao passo que o nocaute da sua expressão (por shRNA), diminuiu a sensibilidade apoptótica *in vitro* além de estimular o crescimento do tumor *in vivo* (Lalier et al., 2007).

1.5.3 Receptores de PGE₂

PGE₂ pode interagir com qualquer um dos seus quatro subtipos de receptores especificados como EP1, EP2, EP3 e EP4 para ativar várias vias de sinalização intracelulares diferentes (figura 4) (Sugimoto, Narumiya, 2007). A interação entre PGE₂ e seus receptores têm sido estudada extensivamente, devido à sua associação com o desenvolvimento do câncer.

O tratamento de células de melanoma (A375 e Hs294T) com agonista específico de EP2 ou de EP4 estimulou a capacidade de migração dessas células (Vaid et al., 2015). Por outro lado, em um estudo realizado com linhagens de tumores mamários

murinos e MCF-7, o silenciamento do receptor EP2 por siRNA e a inibição pelo antagonista (AH6809), diminuíram significativamente a proliferação celular e o número de metástases, concomitante com a redução da expressão de MMP-2 e MMP-9 em câncer de mama (Cheuk et al., 2015; Max et al., 2006).

Em carcinoma de pulmão, estudos usando camundongos nocaute para EP3 ($EP3^{-/-}$), mostraram que a sinalização de EP3 é necessária para metástase e invasão do tumor (Amano et al., 2009).

Em outro estudo feito em câncer de cólon, com ratos nocautes para os receptores EP1 e EP4 revelaram uma diminuição no número e o tamanho dos pólipos (Mutoh et al., 2002; Wang, Dubois, 2006).

Além disso, a alta expressão de EP4 também foi correlacionada com pior sobrevida dos pacientes com gliomas de graus III e IV e nas linhagens U-87MG e LN198 (Ochs et al., 2015).

É importante realçar que apesar dos diversos estudos que apontam para o papel dos receptores EPs no câncer, ainda não se conhece detalhadamente como isso ocorre.

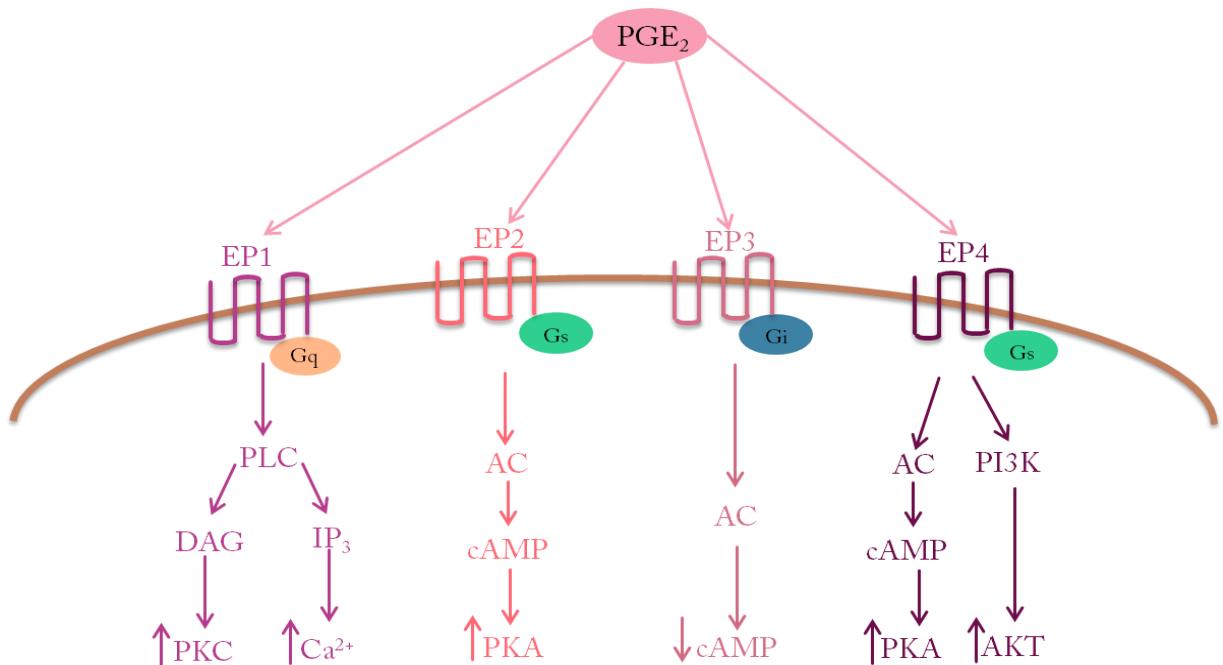


Figura 4 - Mecanismos de transdução de sinal dos receptores EPs de PGE₂.

1.5.4 PGT e 15-PGDH

Os níveis de PGE₂ no organismo não são controlados apenas pela taxa de sua produção, mas também pela sua velocidade de degradação. A degradação dessa prostaglandina ocorre em um processo dividido em dois passos (figura 5) (Nomura et al., 2004).

O primeiro passo é mediado pela PGT, que transporta PGE₂ do meio extracelular para o meio intracelular. Este transportador pertence ao grupo de transportadores de ânions orgânicos (OATP), classificadas dentro da superfamília dos carreadores orgânicos solúveis (SLC), membro 2A1 (SLCO2A1). O grupo OATP, em humanos, consiste de 11 membros, incluindo 10 OATPs e a PGT, classificada como OATP2A1. O décimo primeiro domínio transmembranar é, possivelmente, a região da PGT que confere especificidade no transporte somente de prostaglandinas (Bao et al., 2002; Schuster, 2002).

O segundo passo para a inativação de PGE₂ ocorre no citoplasma, onde a enzima 15-PGDH catalisa a formação de 15-ceto-PG. A 15-ceto-PGE₂ posue atividade biológica reduzida (Ensor, Tai, 1995).

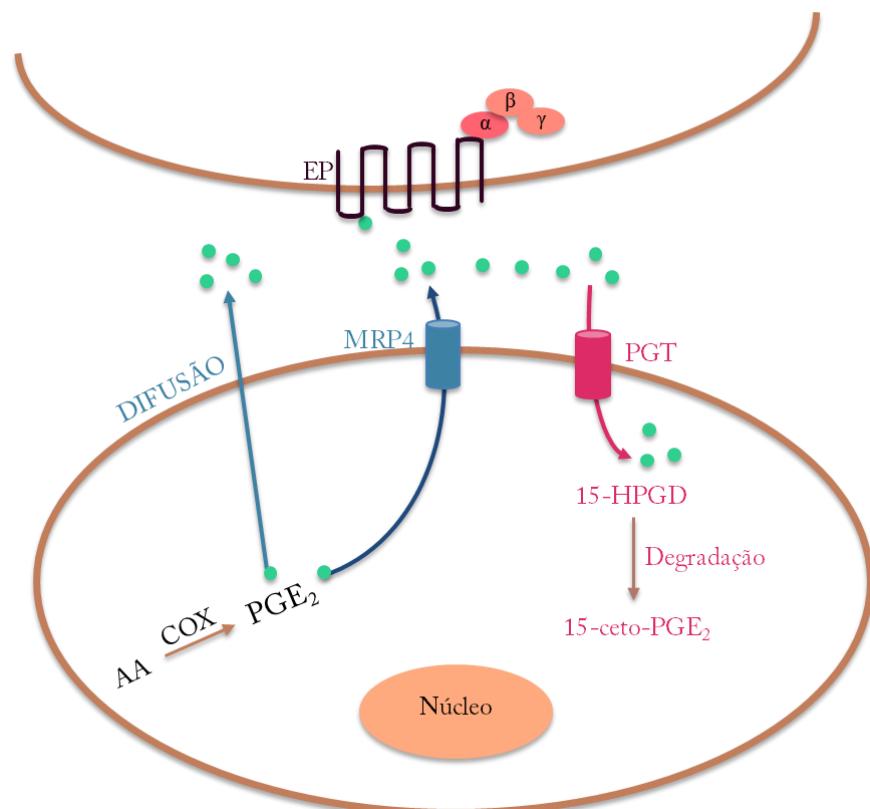


Figura 5 - Via de degradação de PGE₂.

Estudos mostraram que a diminuição nos níveis de expressão de PGT ou 15-PGDH é uma forma muito eficaz para o aumento nos níveis endógenos de PGE₂ (Kochel, Fulton, 2015). Em tumores, a diminuição nos níveis de expressão de PGT e 15-PGDH também estão relacionadas com o aumento de PGE₂ no microambiente extracelular, o que contribui para o desenvolvimento do tumor (Smartt et al., 2012).

Estudos demonstraram que a expressão de PGT está desregulada em câncer de estômago, ovário, renal e de pulmão. Na linhagem celular de câncer colorretal humano HCA-7, a expressão aumentada de PGT reduziu os níveis de PGE₂ no meio extracelular e aumentou os níveis intracelulares de 15-ceto-PGE₂ (Backlund et al., 2005). No entanto, pouco se sabe sobre o papel de PGT no câncer, acredita-se que PGT possa colaborar funcionalmente com 15-PGDH para inativar PGE₂ (Kochel, Fulton, 2015).

A 15-PGDH, atualmente, vem sendo considerada como um possível supressor de tumor antagonizando com a ação de COX-2, uma vez que a diminuição da expressão da 15-PGDH está associada com o aumento da tumorigênese no câncer de mama, cólon, pulmão (Ding et al., 2005)

Em GBM, a 15-PGDH está sendo relacionada com o processo de crescimento celular. Em um estudo realizado com a linhagem celular T98G, foi visto que, quando a enzima COX-2 foi inibida, ocorreu uma expressão aumentada de 15-PGDH e consequentemente uma redução no crescimento celular. Em contrapartida, quando a 15-PGDH foi inibida, o crescimento celular da T98G foi restaurado (Wakimoto et al., 2008).

Em geral, os genes envolvidos na síntese de PGE₂ são vistos como sendo crucial em muitos eventos associados com o desenvolvimento do câncer. Entender e caracterizar as consequências patológicas de cada um desses genes poderia ser de importância vital para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras.

1.6 Migração Celular

A migração celular é um processo em que as células se movem em resposta a estímulos no ambiente celular. Este processo desempenha um papel fundamental em muitos processos fisiológicos diferentes, tais como a embriogênese, formação e manutenção de novos tecidos, trâfico das células do sistema imune, cicatrização de feridas e inflamação (Lauffenburger, Horwitz, 1996).

O processo de migração celular é altamente coordenado entre proteínas do citoesqueleto, moléculas de adesão celular e da matriz extracelular, a fim de mover a célula a partir de uma posição para outra. Este processo pode ser dividido nas seguintes etapas: formação de lamelipódios na parte dianteira do corpo celular, formação de novas adesões focais aos componentes da MEC, degradação local da MEC por meio das MMPs e finalmente o deslocamento do corpo celular e retração da parte traseira da célula (Friedl, Wolf, 2003).

Cada uma destas etapas envolvem interações complexas e coordenadas entre proteínas do citoesqueleto, moléculas de adesão celular, matriz extracelular e vias de sinalização externas e internas extremamente coordenadas (Le Clainche, Carlier, 2008). Qualquer alteração na regulação de um desses mecanismos pode resultar em patologias, tais como defeitos de nascença, doenças autoimunes, inflamação crônica e câncer (Friedl, Wolf, 2010).

A migração das células tumorais tem um papel fundamental na invasão e na progressão do tumor, uma vez que está intimamente ligada à capacidade do tumor metastizar. Estudos têm mostrado que 90% das mortes relacionadas com o câncer é devido a metástases (Bacac, Stamenkovic, 2008; Guan, 2015).

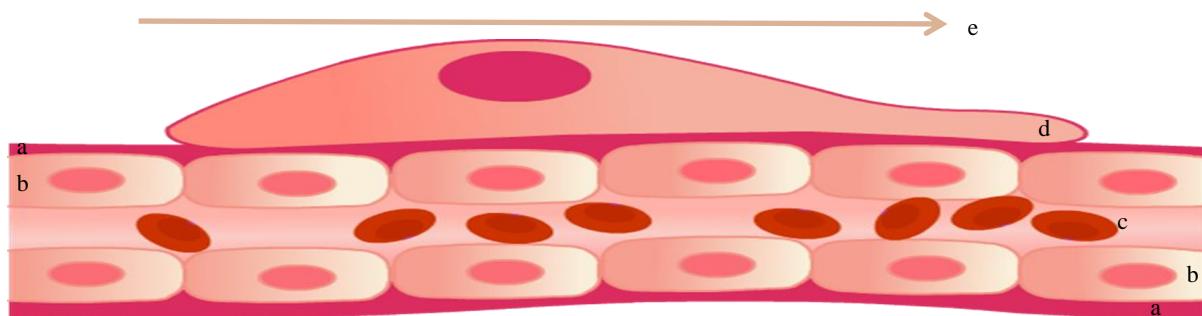


Figura 6 - Representação esquemática de uma célula de GBM migrando. a: membrana basal, b: endotélio, c: hemácias, d: célula de GBM e e: direção da migração.

A biologia tumoral do glioma é bem diferente dos tumores não cerebrais, pois o tumor glial encontra-se confinado num espaço delimitado pela caixa craniana onde cresce somente nos espaços ventriculares preenchidos por fluido cefalorraquidiano ou destruindo e se infiltrando no parênquima cerebral sadio. Sua disseminação deve-se, portanto, à sua capacidade de migração celular ativa através do tecido cerebral (Claes et al., 2007).

Este comportamento migratório junto com a sua capacidade de invadir o tecido normal é um dos aspectos importantes no desenvolvimento e na evolução dos gliomas, além de estar relacionado com fenótipo maligno. O comportamento migratório do glioma foi caracterizado no início da década de 40, quando foi mostrado que as células neoplásicas de glioma tinham uma grande capacidade de migrar para o parênquima cerebral e também o hemisfério contralateral (Scherer, 1940).

Células individuais de GBM são capazes de se infiltrar em direção ao tecido normal de 4 a 7 cm a partir da massa tumoral (Silbergeld, Chicoine, 1997). O caminho de migração das células de GBM não é aleatório, muitas vezes as células invadem o tecido sadio através da membrana basal dos vasos sanguíneos, o espaço subependimal (glia limitante externa) e através da substância branca (figura 6) (Bellail et al., 2004).

Esta natureza invasiva e migratória tem sido uma das principais limitações para uma ressecção cirúrgica bem sucedida, além de ser a principal causa de reincidente do tumor. Dos pacientes que passam por ressecção cirúrgica, 90% dos casos desenvolveram novas lesões cerca de 2-3 cm do local original ou em locais distantes no cérebro. Além disso, as células que migram podem apresentar uma alteração nos genes pró apoptóticos e de proliferação, diminuindo assim a sua susceptibilidade a agentes citotóxicos (Cuddapah et al., 2014; Demuth, Berens, 2004; Joy et al, 2003; Mariani et al., 2001).

Portanto, compreender os mecanismos de migração/invasão dos tumores cerebrais e suas interações com o tecido circundante é um tema de grande importância.

Devido ao fato de que os mecanismos moleculares da migração celular GBM e invasão são altamente complexos, posterior identificação de novas moléculas candidatas que participam nestes processos é crucial para o desenvolvimento de terapia-alvo para GBM.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

O principal objetivo desse estudo foi analisar *in vitro* o papel e os mecanismos de PGE₂ e seus receptores EP2 e EP4 na migração celular das linhagens de gliomas humano U-251MG e U-87MG.

Objetivos específicos

Este estudo teve como objetivos:

- A. Avaliar a expressão gênica das proteínas envolvidas na biossíntese de PGE₂ (COX-1, COX-2, cPGES, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD) nas linhagens de GBM U-251MG e U-87MG
- B. Avaliar a expressão proteica de COX-1, COX-2, cPGES, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD nas linhagens de GBM U-251MG e U-87MG.
- C. Monitorar o perfil de produção de 20 produtos da via das ciclooxigenases: 6kPGF_{1 α} , TXB₃, TXB₂, PGE₃, PGF_{1 α} , PGF_{2 α} , PGD₃, PGE₂, PGE₁, 13,14dhPGF_{2 α} , PGD₁, PGD₂, 15kPGE₂, 13,14dh15kPGF_{2 α} , 13,14dh15kPGF_{1 α} , 13,14dh15kPGE₂, 13,14dh15kPGE₁, PGJ₂, delta12PGJ₂, 15dPGJ₂ nas linhagens U-251MG, U-87MG, T98G, A-172 e U-138MG.
- D. Determinar os efeitos da adição exógena de PGE₁, PGE₂, PGD₁, PGD₂, PGF_{1 α} e PGF_{2 α} na migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG.
- E. Determinar os efeitos da adição exógena dos antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4 (L-161982) na migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG.
- F. Determinar os efeitos da adição exógena de PGE₂ e dos antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4 (L-161982) na migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo laboratório da Profa. Dra Eugenia Costanzi-Strauss (U-251MG), originalmente da ATCC, Prof. Dr Carlos Frederico Martins Menck (U-87MG e U-138MG) do ICB e da Profa. Dra Silvya Stuchi Maria-Engler (T98G e A-172) da FCF, USP.

- ✓ U-251MG: Linhagem celular com propriedade de crescimento aderente, morfologia pleomorfica.
- ✓ U-138MG: Linhagem celular com propriedade de crescimento aderente, morfologia poligonal.
- ✓ T98G: Linhagem celular com propriedade de crescimento aderente, morfologia semelhante a fibroblasto, com potencial altamente invasivo quando cultivado em matrizel.
- ✓ A-172: Linhagem celular com propriedade de crescimento aderente apresenta comportamento não invasivo.
- ✓ U-87MG: Linhagem celular com propriedade de crescimento aderente, morfologia epitelial e potencial invasivo.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos de cultura celular contendo meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico (penicilina 50 U/ml e estreptomicina 50 µg/ml).

As células foram mantidas em estufa à 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de umidade, sendo o meio de cultura trocado a cada dois dias ou sempre que necessário.

Após atingirem 80% de sua confluência, as células foram enzimaticamente desagregadas dos frascos com solução de tripsina/EDTA (0,1% de tripsina e 1 mM de EDTA) centrifugadas e ressuspendidas em DMEM com 10% SFB. A suspensão celular foi subsequentemente dividida em novos frascos de cultura para garantir a manutenção das células e o preparo dos experimentos.

Os estoques celulares foram congelados em alíquotas contendo 10% de SFB e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) e mantidas em nitrogênio líquido.

3.2 Análise da expressão gênica através do qRT-PCR

3.2.1 Extração do RNA

A extração do RNA foi feita segundo o protocolo indicado pelo fabricante do reagente de TRIzol (Invitrogen). Inicialmente, as linhagens celulares (aproximadamente 50 - 100 mg) foram homogeneizadas com o auxílio de um aparelho Politron PT com 1 mL de Trizol. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi adicionado clorofórmio (200 µl), a mistura foi homogeneizada lentamente e incubada novamente à temperatura ambiente, por 15 minutos e centrifugado (10600 rpm a 4 °C) para a separação de fases.

A fase aquosa (superior, transparente), onde o RNA está presente, foi coletada e transferida para um novo tubo. A precipitação do RNA foi feita com adição de isopropanol (500 µL), seguida de centrifugação a 12000g por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi então descartado, e o precipitado contendo o RNA lavado em álcool 75%, para ser novamente centrifugado (10600 rpm, 10 minutos a 4 °C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o RNA dissolvido em água tratada com dimetil pirocarbonato inativa (DEPC) (30 - 50 µL).

As amostras foram quantificadas através da leitura em espectrofotômetro no equipamento Epoch, nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi avaliada pela razão A260/280, na qual os valores maiores que 1,8 foram consideradas de pureza satisfatória. A integridade do RNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio sendo o produto visualizado no equipamento de imagens quimioluminescente G-Box. O RNA purificado foi armazenado no -80 °C até a sua utilização.

3.2.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizado utilizando-se a enzima M-MLV Reverse Transcriptase, de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada amostra utilizou-se 1 µg (linhagens celulares), 2 µl de Random Primer, 2 µl de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) e 12 µl de água milli-Q autoclavada. As amostras foram incubadas no termociclador a 65 °C por 2 minutos e imediatamente transferidas para o gelo por 2 minutos. Após esta etapa, foi adicionado as amostras 4 µl de RT buffer 5 x, 2 µl de DTT e 1 µl de RNase OUT e incubadas no termociclador a 37 °C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionada as

amostras 1 µl de M-MLV e incubadas no termociclador a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 50 minutos e 70 °C por 10 minutos.

A integridade do cDNA foi observada através de eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio sendo o produto visualizado no equipamento de imagens quimioluminescente G-Box (figura 7 A).

3.2.3 Desenho dos primers

As sequências dos primers utilizados para as amplificações dos genes nos experimentos de qPCT-PCR foram desenhados com o auxílio do software PerlPrimer (Marshall, 2004). Para garantir a eficiência e especificidade dos primers alguns critérios foram adotados como: quantidade de CG entre 30 e 80%, amplificação de fragmentos com tamanho entre 50-150pb, temperatura de anelamento entre 58 °C e 60 °C e incapacidade de formação de dímeros ou estruturas secundárias. Além disso, a fim de evitar o risco de possíveis amplificações de produtos do DNA genômico, os pares de primers foram desenhados em exons diferentes para cada um dos transcritos analisados. Todos estes critérios tiveram com objetivo garantir a eficiência e especificidade das reações e ser o mais rigoroso possível em relação aos mesmos. O programa Primer Express 3.0 foi utilizado para verificar a temperatura de anelamento, presença de estruturas secundárias e proporção CG.

Os primers desenhados foram checados quanto a sua especificidade pelo programa pelo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Foi utilizado como normalizador o gene TBP (TATA box binding protein). (Aithal, Rajeswari et al., 2015; Valente et al., 2009). Os primers utilizados foram sintetizados pela Invitrogen (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequências dos primers utilizados em reações de RT-PCR

Gene	Sense	Antisense
COX-1	GAAACCCTACACCTCCTTCC	CCACTGGCATCGTGATGGA
COX-2	TCAGCCATACAGCAAATCCT	CTTGAAGTCGGTAAGTATGTAGTG
cPGES	GTGATGAGGATGTAGATTACAG	GCCTTAGAGCTATCAACTCAGGA
mPGES1	CTTGAAGTCGGTAAGTATGTAGTG	CACATCTCAGGTACGGGTC
mPGES2	CTGTCCCATGGCTACATCCT	CGCCACAAACCTTCCTTTA
EP2	ACCTACTTCGCTTCGCCAT	CGTACTGCCATAGTCCAGC
EP4	GACCTGTTGGGCACTTGTT	TGGACGCATAGACTGCAAAG
PGT	CCACAGCAGATGAAGCAAGG	GTTCACAGCACCAATGAGG
15-HPGD	CTTTAGCAGGACTCATGCC	CAATTGATTCAAGGATGGCTGTG
TBP	CCACTCCACTGTATCCCTCC	GACTGTTCTTCACTCTGGCT

3.2.4 Determinação de temperatura dos primers

Para a determinação da melhor temperatura de anelamento, foi feito uma reação de PCR convencional para cada par de primers, em que se testaram cinco temperaturas diferentes. Os primers foram diluídos para obter a concentração de 100 μM .

A reação de PCR foi realizada utilizando 0,5 μl de dNTP, 0,75 μl MgCl_2 , 2,5 μl PCR buffer, 0,25 μl Platinum *Taq* DNA, 1 μl de sense, 1 μl de anti sense, 1 μl de cDNA e o restante de H_2O milli-Q autoclavada para um volume final da reação de 12 μl . Como controle positivo da reação de PCR, foi utilizado um par de primers para a detecção do gene codificador da subunidade 18S ribossomal e como controle negativo da reação, foi feita a substituição da mesma quantidade que seria colocada de cDNA por água Milli-Q autoclavada.

Todos os primers COX-1, COX-2, cPGES, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4, PGT, 15-HPGD, 18S, TBP e HPRT1, foram analisados em oito temperaturas diferentes (56,5 °C, 59,1 °C, 61,8 °C, 64,5 °C, 67 °C, 69,1 °C, 70,6 °C e 71,5 °C).

O PCR foi realizado em três etapas: 94 °C por 1 minuto, temperatura específica 56,5 °C, 59,1 °C, 61,8 °C, 64,5 °C, 67 °C, 69,1 °C, 70,6 °C e 71,5 °C) por 1minuto e 72 °C por 1minuto por 40 ciclos (Tabela 4).

Assim, foi possível verificar, quais das temperaturas obtiverem o melhor anelamento para ser usado nas reações. Os produtos da reação foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

Tabela 4 - Temperaturas utilizadas para qRT-PCR.

Gene	Temp	Gene	Temp
COX-1	56,5	EP4	56,5
COX-2	56,5	PGT	56,5
cPGES	59,1	15-HPGD	56,5
mPGES1	56,5	18S	56,5
mPGES2	56,5	TBP	56,5
EP2	56,5	HPRT-1	56,5

3.2.5 Determinação da concentração dos primers

A fim de padronizar a melhor concentração de primers para a reação de PCR em tempo real, foram testadas para cada primer as concentrações finais de 200 nM, 400 nM e 800 nM (figura 7 C).

As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). O volume total das reações de qRT-PCR foi de 12 µl, sendo 6 µl de SYBR® Green, 3 µl (10 mM) da mistura de primers (sense e antisense) e 3 µl de cDNA das amostras. As amplificações foram realizadas através do equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando-se o seguinte programa: 50 °C por 2 minutos (incubação), 95 °C por 10 minutos (ativação), 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação do cDNA) e temperatura específica de cada oligonucleotídeos por 1 minuto (anelamento dos primers). Os controles negativos das reações foram feitos substituindo o cDNA por água Milli-Q autoclavada (NTC - No Template Control).

Desta forma, determinou-se a menor concentração final de primers necessária para a amplificação do produto de interesse, sem que ocorra variação no valor do Ct

(*Cycle Threshold*) e no perfil da curva de amplificação genica, além da mínima ou inexistente formação de dímeros. As razões de concentração de primers (em nM) utilizadas para cada gene estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações utilizadas nas reações de qRT-PCR.

Gene	[]nM	Gene	[]nM
COX-1	400	EP4	200
COX-2	400	PGT	200
cPGES	400	15-HPGD	200
mPGES1	200	TBP	200
mPGES2	200	-	-
EP2	400	-	-

3.2.6 Determinação da eficiência dos primers

As eficiências dos primers foram obtidas a partir de diluições seriadas de cDNA (1:2) partindo de 25 ng de material até 1,56 ng. Para cada concentração de cDNA foi preparada uma reação com 6 µl de SYBR® Green, 3 µl da mistura de primers (sense e antisense) (na concentração determinada anteriormente) e 3 µl de cDNA das amostras. As amplificações foram realizadas através do equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando-se o seguinte programa: 50 °C por 2 minutos (incubação), 95 °C por 10 minutos (ativação), 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação do cDNA) e 60 °C por 1 minuto (anelamento dos primers). Os controles negativos das reações foram feitos substituindo o cDNA por água Milli-Q autoclavada (NTC - No Template Control).

Os valores obtidos dessas reações serviram para construir uma curva padrão para cada par de primer testado. A inclinação da reta foi calculada a partir de regressão linear simples e posteriormente foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson. O valor de inclinação da reta foi empregado na formula $E = 10^{(-1/slope)}$ (Rasmussen, 2001), onde o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida da regressão entre os valores de Ct (*Cycle Threshold*) dos transcritos e os valores do logaritmo das diferentes diluições de cDNA (curva padrão de eficiência), sendo

considerados aceitáveis valores de eficiência entre 1,8 e 2,2, o que corresponde a uma eficiência da reação entre 90-110% (figura 7 D).

3.2.7 Reação de qRT-PCR

As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando do kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). O volume total das reações de qRT-PCR foi de 12 µl, sendo 6 µl de SYBR® Green, 3 µl da mistura de primers (sense e antisense), na concentração final previamente determinada, e 3 µl de cDNA das amostras. As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços e posteriormente seladas. As amplificações foram realizadas através do equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando-se o seguinte programa: 50 °C por 2 minutos (incubação), 95 °C por 10 minutos (ativação), 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação do cDNA) e temperatura específica de cada oligonucleotídeos por 1 minuto (anelamento dos primers). Os controles negativos das reações foram feitos substituindo o cDNA por água Milli-Q autoclavada (NTC - No Template Control) (figura 7 E e F).

Para cada experimento foram feitas triplicata biológica com duplicatas experimentais.

3.2.8 Análise de dados do qRT-PCR

Após o término das reações, os dados foram coletados e analisados segundo o modelo de Pfaffl, que utiliza os valores das eficiências dos primers para o cálculo das quantificações relativas. A expressão relativa do gene alvo é calculado baseando-se na eficiência de amplificação e no ciclo do PCR onde foi detectado o aumento da fluorescência acima do sinal basal (Ct) (Pfaffl, 2001).

O método utiliza a seguinte fórmula:

$$\text{Expressão Relativa (R)} = (E_{\text{alvo}})^{\Delta CT_{\text{alvo}}} / (E_{\text{ref}})^{\Delta CT_{\text{ref}}}$$

Onde:

E_{alvo} = Eficiência da reação de PCR dos genes alvos

E_{ref} = Eficiência da reação de PCR do gene controle endógeno

ΔCT = Ct controle – Ct amostra

A relação apresentada acima foi facilitada com o desenvolvimento do programa REST® (relative expression software tool), onde os dados são submetidos

a análises estatísticas, considerando-se significativos os valores de probabilidade de $p<0,05$.

O software leva em consideração os valores de eficiência dos primers de cada gene nas análises estatísticas. (Pfafll et al., 2001).

3.3 Imunofluorescência

As células foram cultivadas em lamínulas de vidro circulares com diâmetro compatível com as placas de 24 poços contendo meio de cultura. Após o período de crescimento o meio de cultura foi retirado e as células lavadas delicadamente com PBS e fixadas com 4% de formaldeído em fosfato tampão (0,1 M – pH 7,2 a 7,4) por 30 minutos e depois lavadas 3 veze em PBS.

A seguir, para bloquear os sítios inespecíficos, as células foram incubadas com solução de bloqueio (1% de albumina de soro bovino + 5% de soro de burro + 0,01% Triton X-100 em PBS [PBST]) durante 1 hora em temperatura ambiente. Após o período de bloqueio, as células foram incubadas “overnight” com os respectivos anticorpos primários diluídos em PBST à temperatura ambiente. As descrições dos anticorpos utilizados e suas respectivas concentrações estão na Tabela 6. Os controles negativos experimentais receberam apenas PBST.

No dia seguinte, as células foram lavadas 3 vezes com PBST e incubadas por 90 minutos com o anticorpo secundário conjugado com Alexia 488 (1:1000) à temperatura ambiente e protegido da luz. Em alguns casos foi usado faloidina-rodamina para marcação de filamentos de actina. Para coloração dos núcleos as células também foram incubadas por 5 minutos com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole-Sigma). Finalmente as lamínulas contendo as células foram lavadas 2 vezes com PBST e 1 vez com PBS.

Ao final das lavagens, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando Vectashield. As imagens foram obtidas por microscopia de epifluorescência, utilizando Zeiss Axiovision Z1.

Tabela 6 - Anticorpos usados em imunofluorescência.

Gene	Origem	Fabricante	Fabricante	Diluições
		1º	2º	
COX-1	Camundongo	abcam	abcam	1:200
COX-2	Cabra	abcam	abcam	1:200
cPGES	Coelho	cayman	abcam	1:50
mPGES1	Coelho	cayman	abcam	1:200
mPGES2	Coelho	cayman	abcam	1:200
EP2	Coelho	abcam	abcam	1:100
EP4	Coelho	abcam	abcam	1:100
PGT	Coelho	abcam	abcam	1:200
15-HPGD	Coelho	abcam	abcam	1:200

3.4 LC/ESI-MS/MS

Para definir o perfil de produção das prostaglandinas nas linhagens T98G, U-138MG, A-172, U-251MG e U-87MG, usamos cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa de spray eletrônico de ionização em tandem (LC/ESI-MS/MS).

As amostras foram ajustadas para 15% (v / v) em metanol gelado e mantida a 4 °C. Quarenta nanogramas do padrão interno recentemente preparado (PGB₂-d4) foram adicionados a cada amostra.

Após 15 minutos, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm durante 5 minutos) e as proteínas precipitadas foram removidas e o sobrenadante acidificada até pH 3,0 com ácido clorídrico 0,1 M e imediatamente colocadas em colunas C18 SPE pré-condicionada com 20 mL de metanol e 20 mL de água. Em seguida a coluna foi lavada com 20 ml de metanol 15%, em seguida foi lavada com 20 ml de H₂O e 10 ml de Hexano.

Finalmente, os eicosanoides foram eluídos em 15 mL de formato de metilo. O solvente foi evaporado com nitrogênio, no escuro e o resíduo foi dissolvido em 200 µL de etanol 70% (v / v) para ser injectado no LC-MS / MS.

O aparelho Thermo Accela TSQ Quantum Max LC-MS / MS foi operado no modo de ionização por electrospray negativo. Linhas de calibração foram executados para os 21 prostanoïdes contendo de 1 pg / mL a 200 pg / mL.

As condições óptimas para cada prostanoide individual foi determinado por infusão direta de uma solução padrão de 10 ng / mL.

A coluna de cromatografia C18, Luna 2.0 x 150 mm, da Phenomenex foi utilizada, e o volume da amostra foi de 5 µL a uma taxa de fluxo de 350µL / min com amostras mantida a 8 °C.

As amostras foram corridas utilizando um solvente A - H₂O (0,2% de ácido acético); solvente C - acetonitrilo (0,2% ácido acético).

Com um gradiente da seguinte maneira: - 0-10 min, 60% de A: 40% C; 10.01-13 min, 60% -10% de A: 40% -90% C; 13.01-15 min, 10% de A: 90% C; 15-15.01 min, 10% -60% de A: 90% -40% C; 15.01-19 min, 60% de A: 40% C; 19.01 min-end, 100% A. Os resultados foram analisados usando o software Thermo XCalibur.

3.5 Migração Celular

3.5.1 Padronizações das concentrações dos prostanoïdes e dos antagonistas EP2 e EP4

Para testar a influência dos eicosanoides sobre a linhagem celular U-251MG e U-87MG foi realizado um primeiro ensaio de migração para determinar as concentrações de PGE₁, PGE₂, PGD₁, PGD₂, PGF_{1α} e PGF_{2α} exógena e dos antagonistas dos receptores EP2 e EP4 que seriam utilizadas.

Foram plaqueadas 3 x 10⁴ células por transwell, em placas de 24 poços e tratadas por 12 horas com as seguintes concentrações de PGE₁, PGE₂, PGD₁, PGD₂, PGF_{1α} ou PGF_{2α}: 1 µM, 5 µM e 10 µM. Para os antagonistas AH6809 e L-161982 as concentrações testadas foram de 0,1 µM, 1 µM e 10 µM.

A migração celular foi avaliada utilizando insertos de cultura celular do tipo Transwell com membrana de policarbonato de poros de 8 µM em placas de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, USA).

As células U-251MG e U-87MG (3 x 10⁴ células por poço) foram semeadas na parte superior do inserto com 200 µl de meio de cultura com SFB. Na parte inferior do inserto, foi também adicionado 200 µl meio de cultura acrescido de SFB.

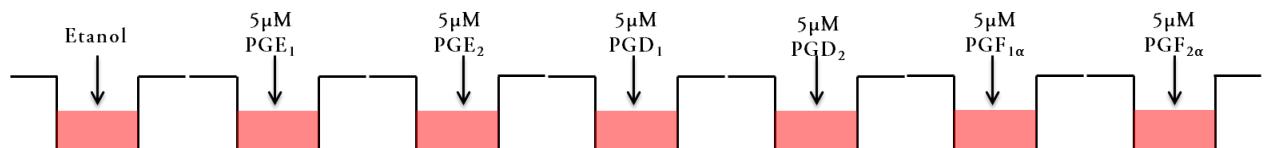
Após o período de aderência das células, os meios de cultura da parte superior e inferior dos insertos foram trocados por novos meios de cultura acrescido dos seus tratamentos específicos.

3.5.2 Ensaio de migração

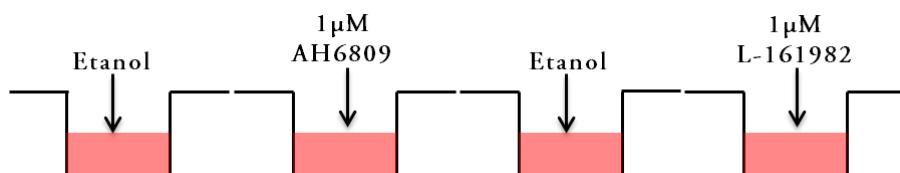
Após a determinação das concentrações dos prostanoïdes PGE₁, PGE₂, PGD₁, PGD₂, PGF_{1α} e PGF_{2α} (5 μM), e dos antagonistas AH6809 e L-161982 (1 μM), novos ensaios foram realizados.

As células U-251MG e U-87MG (3×10^4 células por poço) foram semeadas na parte superior do inserto com 200 μl meio de cultura específico para cada linhagem (DMEM ou DMEM/F12) com SFB. Na parte inferior do inserto, foi adicionado 200 μl meio de cultura (DMEM ou DMEM/F12) e SFB. As células foram incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de umidade por um período de aproximadamente 12 horas (aderência das células). Após o período de aderência das células, os meios de cultura da parte superior e inferior dos insertos foram trocados por novos meios de cultura acrescido dos seguintes tratamentos.

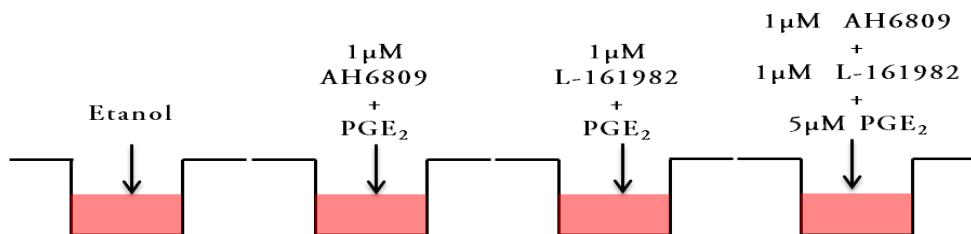
-Tratamento 1: Prostanoides por 12 horas nas linhagens U-251MG e U-87MG na concentração de 5 μM.



-Tratamento 2: Antagonista de EP2 (AH6809) e Antagonista de EP4 (L-161982) por 12 horas nas linhagens U-251MG e U-87MG na concentração de 1 μM.



-Tratamento 3: Antagonistas de EP2(AH6809) e EP4 (L-161982) por 1 hora. Passado esse período, foi adicionado PGE₂ por mais 11 horas nas linhagens U-251MG e U-87MG na concentração de 1 μ M.



No final dos tratamentos, as células que não migraram (parte superior da membrana) foram removidas com cotonetes. As células que migraram (parte inferior da membrana) foram fixadas com etanol (70%) e coradas com cristal de violeta (0,05%) por 30 minutos. Em seguida para retirar o excesso de cristal de violeta os inserts foram lavados com PBS e deixados para secar a temperatura ambiente por algumas horas. Após a secagem, as membranas foram delicadamente removidas dos inserts com o auxílio de um bisturi e pinça e montadas em uma lâmina e recoberta com uma lamínula. Dez campos randomizados por membrana foram capturados em aumento final de x 200 no microscópio Nikon Optiphot-II equipado com uma câmera Cool Snap Pro. Foram realizados três experimentos independentes.

3.6 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa Graph Pad instat, utilizando o teste t de Student para dois grupos. Para comparações múltiplas foi utilizado ANOVA com pos-teste Tukey. As diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$.

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados com o auxílio do Setor de Estatística do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob a supervisão da Sra Rosana Duarte Prisco. Utilizou-se o software estatístico Statgraphics Centurion XVI versão 16.2.04, Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia.

4 RESULTADOS

4.1 Otimização das reações de qRT-PCR

Os níveis de expressão de mRNA dos genes (COX-1, COX-2, cPGES, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4, PGT, 15-HPGD e TBP), foram quantificados através da técnica de qRT-PCR. As reações foram otimizadas inicialmente para cada gene com relação as concentrações mínimas de primer para todos os genes (alvos e referências). Todos os primers foram analisados quanto à sua eficiência de amplificação com diluições seriadas de cDNA.

O gene TBP foi escolhido com base na literatura e nos dados já estabelecidos pelo nosso laboratório anteriormente. O TBP é um dos genes mais usados como controle interno em vários estudos de expressão gênica envolvendo amostras de pacientes e linhagens de GBM.

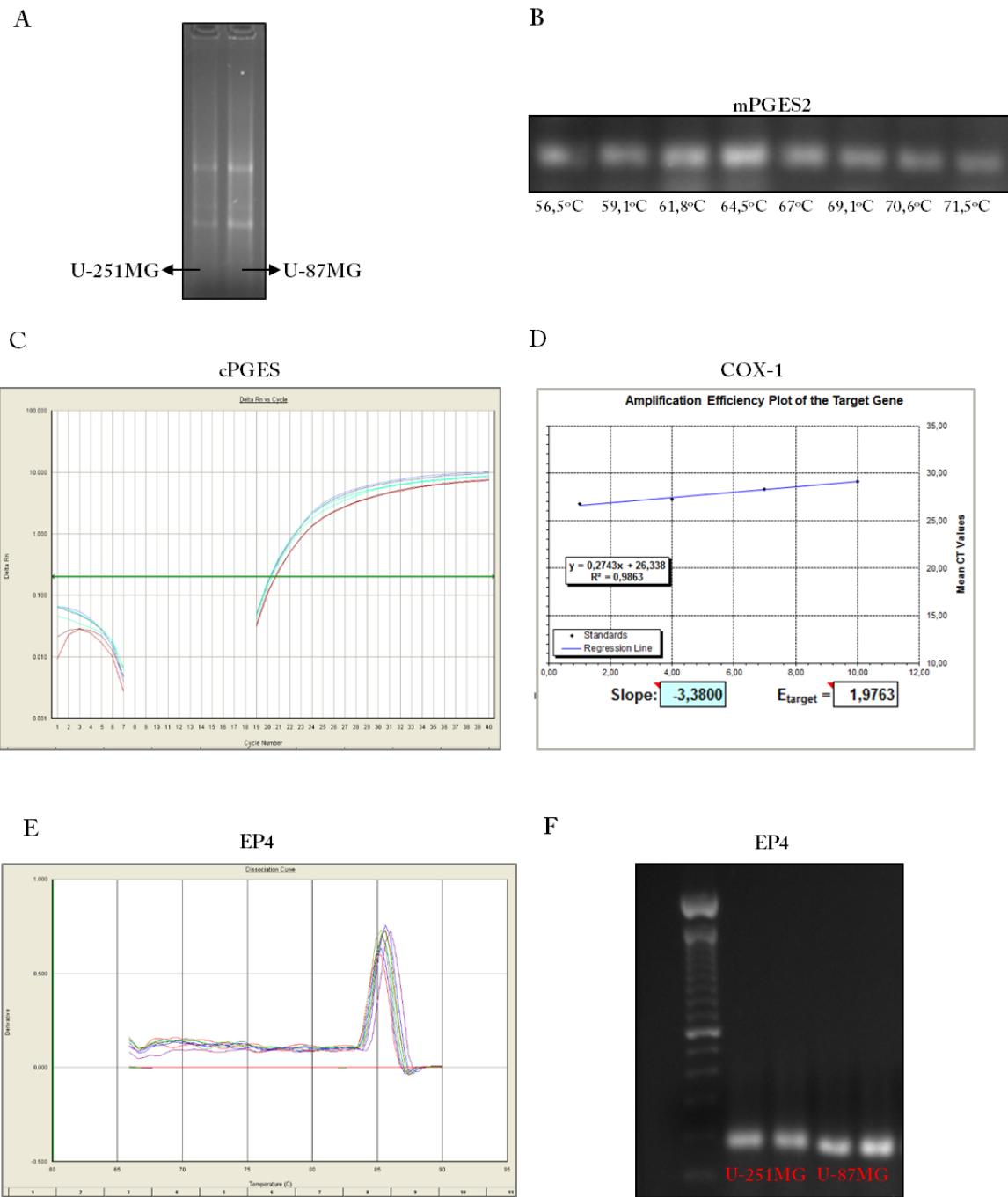


Figura 7 - Padronizações qRT-PCR. **(A)** Gel de agarose (1,5%) do cDNA das linhagem U-251MG e U-87MG. **(B)** Gel de agarose (1,5%) do teste de temperatura de mPGES2 em gel de agarose a 1,5%. **(C)** Curvas de concentrações (200 nM, 400 nM e 800 nM) do primer cPGES. **(D)** Curva padrão do gene COX-1. **(E)** Curva de dissociação do gene EP4 nas linhagens U-251MG e U-87MG. **(F)** Gel de agarose (1,5%) da expressão de EP4 nas linhagens U-251MG e U-87MG.

4.2 Análise da expressão gênica nas linhagens U-251MG e U-87MG

Após a otimização dos primers, as expressões dos genes foram avaliados por qRT-PCR nas linhagens U-251MG e U-87MG. Os resultados demonstram que em ambas as linhagens ocorreu a expressão de todos os genes analisados (COX-1, COX-2, mPGES1, mPGES2, cPGES, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD) (figura 8).

Na linhagem U-251MG, observamos uma maior expressão da mPGES1, mPGES2 e do receptor EP4 em relação aos mesmos genes na linhagem U-87MG.

No caso da linhagem U-87MG as maiores expressões em relação a linhagem U-251MG, foram dos genes COX-2 e EP2.

Apesar das diferenças encontradas, foi possível observar algumas semelhanças entre as linhagens. Um exemplo, foi a sintase cPGES, que além de apresentar uma semelhança de expressão entre as linhagens, apresentou também uma maior expressão quando comparada aos outros genes da via. Outro exemplo, foi em relação aos genes envolvidos na via de degradação, PGT e 15-HPGD, que apresentaram semelhanças de expressão entre as linhagens, além de menor expressão entre os demais genes.

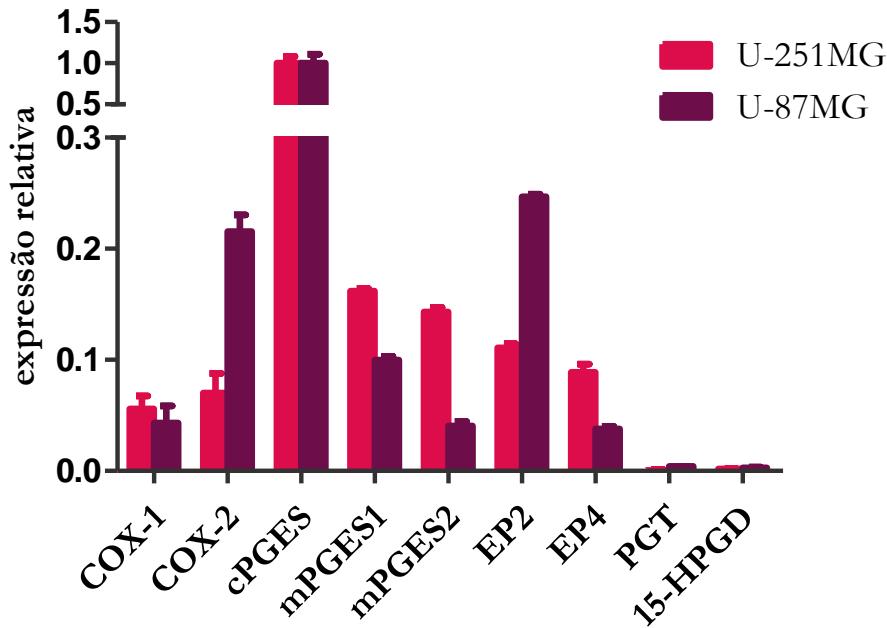


Figura 8 - Análise da expressão gênica por qRT-PCR nas linhagens U-251MG e U-87MG. Expressão relativa dos genes COX-1, COX-2, mPGES1, mPGES2, cPGES, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD. Todas as amostras representam N=3 feitos em duplicatas.

4.3 Imunofluorescência nas linhagens U-251MG e U-87MG

Os ensaios de imunofluorescência foram realizado nas linhagens U-251MG e U-87MG, para analisar a expressão e localização das proteínas COX-1, COX-2, cPGES, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD, além de complementar os dados obtidos qRTPCR.

Os resultados mostraram na linhagem U-251MG uma marcação forte das proteínas COX-1, mPGES2, EP2, EP4 e 15-HPGD. Para as proteínas COX-2 e mPGES1 a marcação foi fraca. Em relação à cPGES e PGT nenhuma marcação foi constatada na linhagem U-251MG (figura 9).

Na linhagem U-87MG as proteínas COX-1, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD tiveram uma forte marcação. Enquanto que nas proteínas COX-2 e cPGES observamos uma fraca marcação (figura 10).

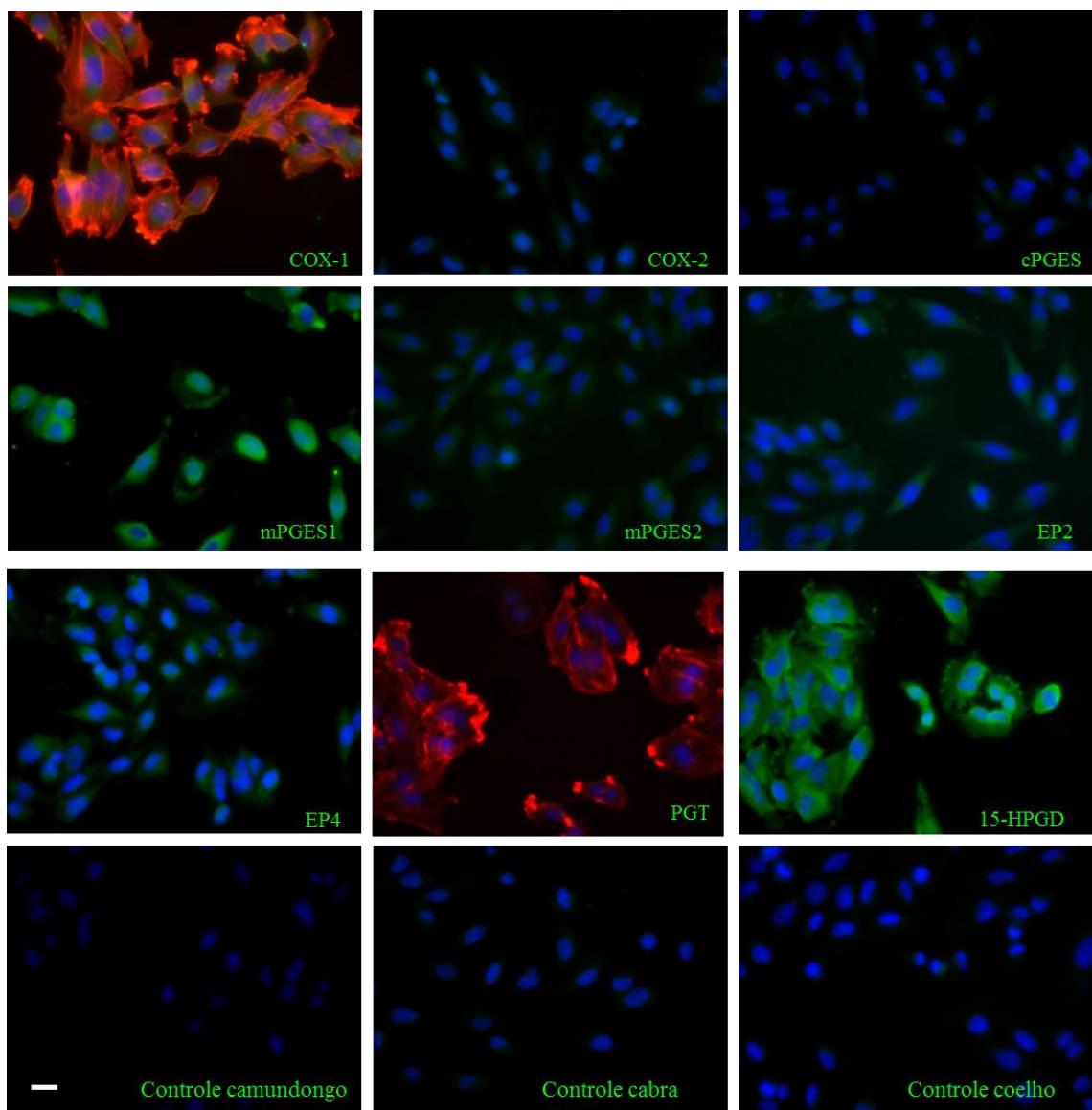


Figura 9 - Imunofluorescência da célula U-251MG. Imagens da expressão das proteínas COX-1, COX-2, cPGES, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD (verde) em U-251MG. DAPI (azul) para marcação do núcleo e Rodamina-Faloidina (vermelho) para marcação da actina. Barra de escala = 50 μ M.

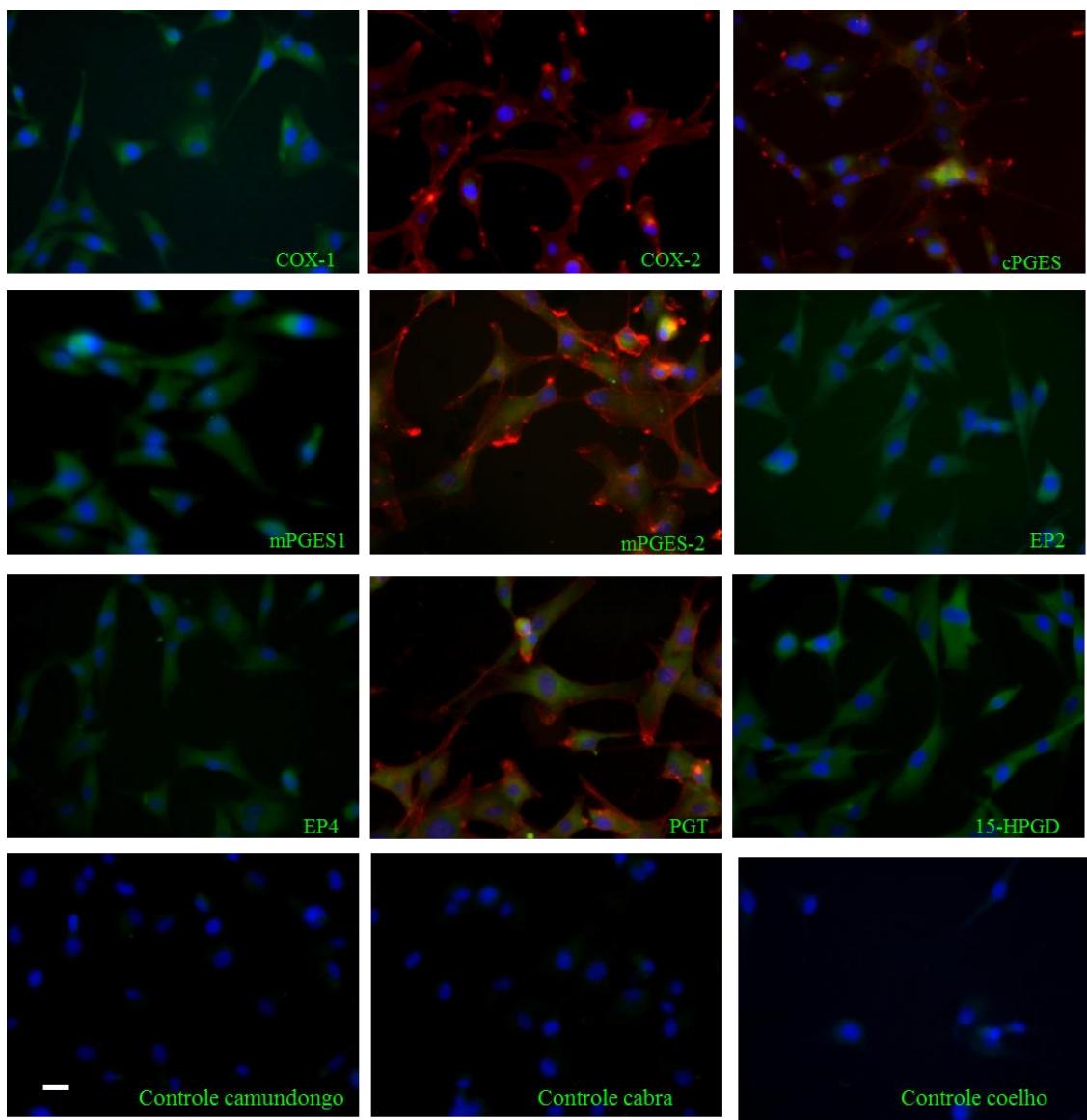
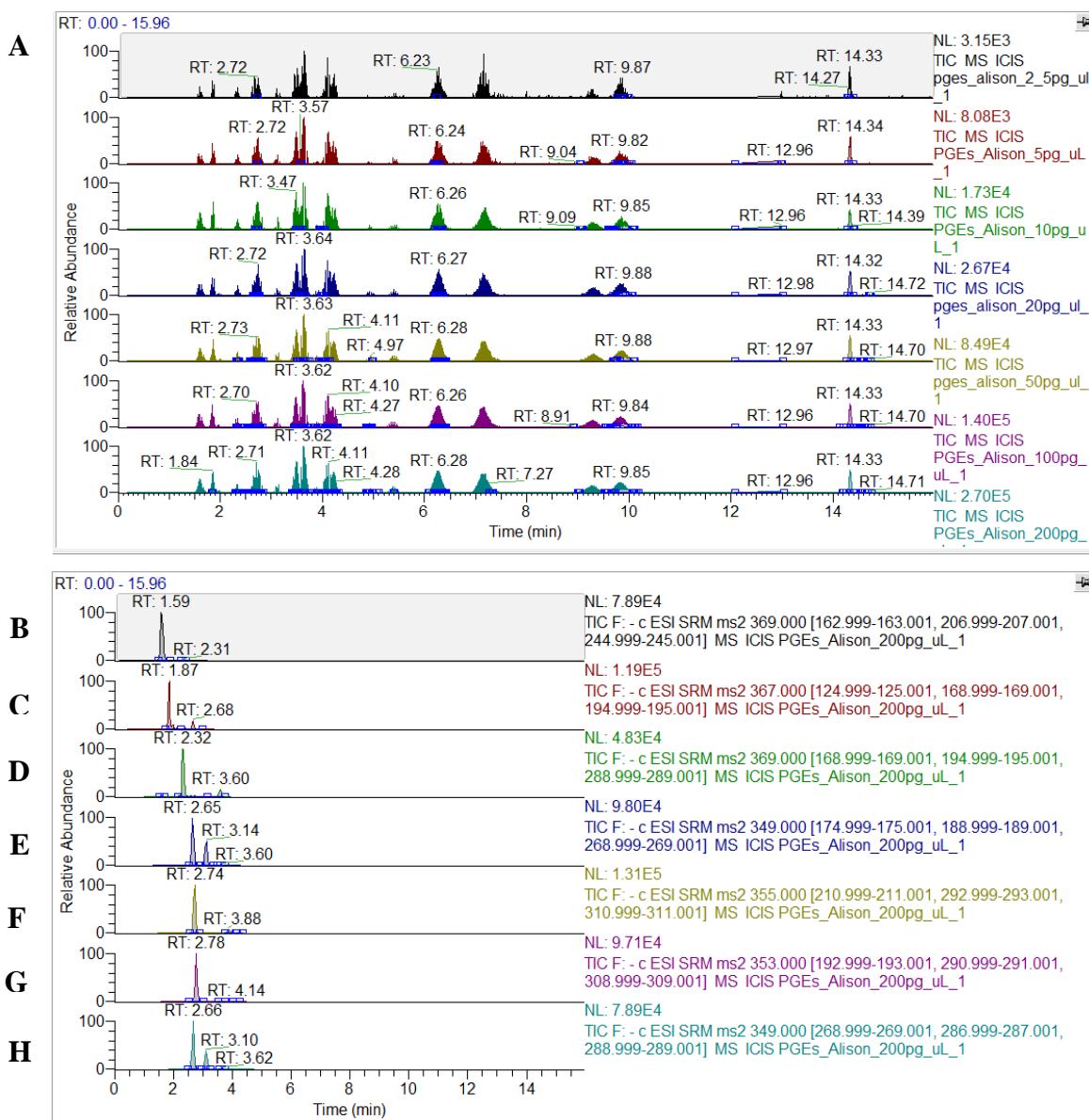


Figura 10 - Imunofluorescência da célula U-87MG. Imagens da expressão das proteínas COX-1, COX-2, cPGES, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD (verde) em U-87MG. DAPI (azul) para marcação do núcleo e Rodamina-Faloidina (vermelho) para marcação da actina. Barra de escala = 50 μ M.

4.4 LC/ESI-MS/MS nas linhagens de GBM

Foram monitorados 20 produtos da via das ciclooxigenases (prostanoides da série 1, série 2 e série 3) incluindo: 6kPGF_{1α}, TXB₃, TXB₂, PGE₃, PGF_{1α}, PGF_{2α}, PGD₃, PGE₂, PGE₁, 13,14dhPGF_{2α}, PGD₁, PGD₂, 15kPGE₂, 13,14dh15kPGF_{2α}, 13,14dh15kPGF_{1α}, 13,14dh15kPGE₂, 13,14dh15kPGE₁, PGJ₂, delta12PGJ₂, 15dPGJ₂, mais o controle interno PGB₂- d4, no aparelho Thermo Accela TSQ Quantum Max LC-MS/MS (figura 11) (Tabela 7).



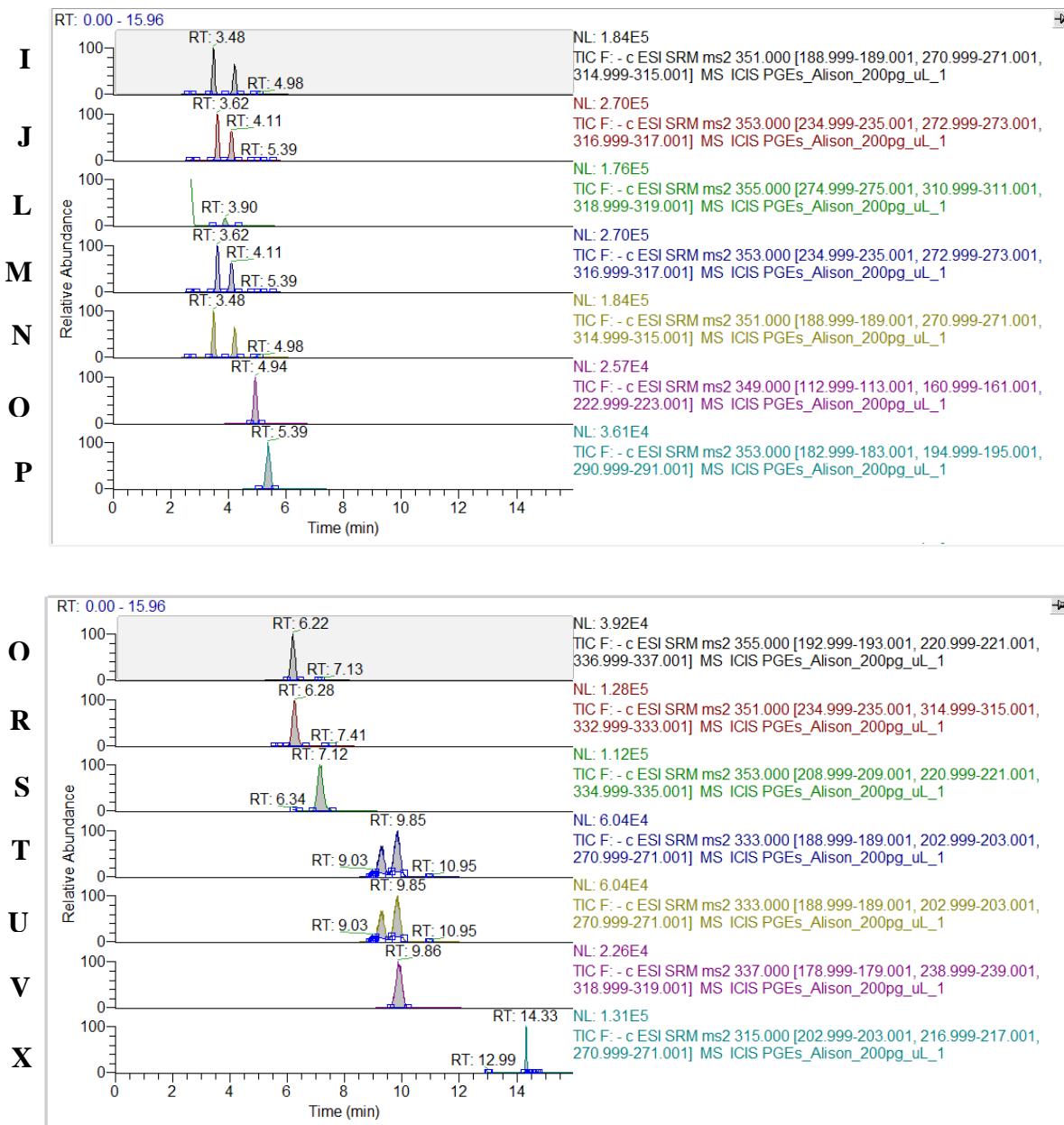


Figura 11 - Cromatograma completa dos 21 prostanoïdes monitorados (A) e reações ms2 dos prostanoïdes individuais (B) 6kF_{1α}, (C) TXB₃, (D) TXB₂, (E) PGE₃, (F) PGF_{1α}, (G) PGF_{2α}, (H) PGD₃, (I) PGE₂, (J) PGE₁, (L) 13.14dhPGF_{2α}, (M) PGD₁, (N) PGD₂, (O) 15kPGE₂, (P) dkPGF_{2α}, (Q) 13.14dh15PGF_{1α}, (R) dkPGE2, (S) 13.14dh15PGE₁, (T) PGJ₂, (U) PGdelta12-J₂, (V) PGB_{2-d4}, (X) 15dPGJ₂.

Tabela 7 - Lista de *m/z* e transições monitoradas para cada prostanoide analisado.

<i>m/z</i> Transitions	CE (v)	Scan Time(s)	Scan Window (min)		Tube Lens (V)	Analytes	
369	163	29	0.1	0.93	2.43	86	6kF _{1α}
369	207	24	0.1	0.93	2.43	86	6kF _{1α}
369	245	28	0.1	0.93	2.43	86	6kF _{1α}
367	125	27	0.05	1.19	2.69	65	TXB ₃
367	169	15	0.05	1.19	2.69	65	TXB ₃
367	195	14	0.05	1.19	2.69	65	TXB ₃
369	169	27	0.1	1.75	3.25	73	TXB ₂
369	195	27	0.1	1.75	3.25	73	TXB ₂
369	289	30	0.1	1.75	3.25	73	TXB ₂
349	175	16	0.05	2.06	3.56	65	PGE ₃
349	189	18	0.05	2.06	3.56	65	PGE ₃
349	269	14	0.05	2.06	3.56	65	PGE ₃
355	211	19	0.05	2.19	3.69	89	PGF _{1α}
355	293	20	0.05	2.19	3.69	89	PGF _{1α}
355	311	16	0.05	2.19	3.69	89	PGF _{1α}
353	193	28	0.1	2.3	3.8	82	PGF ₂
353	291	23	0.1	2.3	3.8	82	PGF ₂
353	309	21	0.1	2.3	3.8	82	PGF ₂
349	269	13	0.05	2.54	4.04	68	PGD ₃
349	287	25	0.05	2.54	4.04	68	PGD ₃
349	289	17	0.05	2.54	4.04	68	PGD ₃
351	189	21	0.1	3.09	4.59	65	PGE ₂
351	271	19	0.1	3.09	4.59	65	PGE ₂
351	315	15	0.1	3.09	4.59	65	PGE ₂
353	235	17	0.1	3.24	4.74	70	PGE ₁
353	273	22	0.1	3.24	4.74	70	PGE ₁
353	317	16	0.1	3.24	4.74	70	PGE ₁
355	275	20	0.1	3.4	4.9	89	13.14dhPGF _{2α}
355	311	20	0.1	3.4	4.9	89	13.14dhPGF _{2α}
355	319	20	0.1	3.4	4.9	89	13.14dhPGF _{2α}
353	235	13	0.1	3.62	5.12	66	PGD ₁
353	273	20	0.1	3.62	5.12	66	PGD ₁
353	317	15	0.1	3.62	5.12	66	PGD ₁
351	189	22	0.1	3.85	5.35	63	PGD ₂
351	271	19	0.1	3.85	5.35	63	PGD ₂
351	315	14	0.1	3.85	5.35	63	PGD ₂

349	113	20	0.05	4.53	6.03	67	15kPGE ₂
349	161	20	0.05	4.53	6.03	67	15kPGE ₂
349	223	16	0.05	4.53	6.03	67	15kPGE ₂
353	183	26	0.1	5.18	6.68	85	dkPGF _{2a}
353	195	25	0.1	5.18	6.68	85	dkPGF _{2a}
353	291	22	0.1	5.18	6.68	85	dkPGF _{2a}
355	193	24	0.05	5.94	7.44	93	13.14dh15PGF _{1a}
355	221	26	0.05	5.94	7.44	93	13.14dh15PGF _{1a}
355	337	20	0.05	5.94	7.44	93	13.14dh15PGF _{1a}
351	235	25	0.1	6.12	7.62	67	dkPGE ₂
351	315	20	0.1	6.12	7.62	67	dkPGE ₂
351	333	15	0.1	6.12	7.62	67	dkPGE ₂
353	209	22	0.05	6.91	8.41	60	13.14dh15PGE ₁
353	221	20	0.05	6.91	8.41	60	13.14dh15PGE ₁
353	335	13	0.05	6.91	8.41	60	13.14dh15PGE ₁
333	189	17	0.05	9.26	10.76	63	PGJ ₂
333	203	24	0.05	9.26	10.76	63	PGJ ₂
333	271	14	0.05	9.26	10.76	63	PGJ ₂
333	189	16	0.1	9.76	11.26	60	PGdelta12-J ₂
333	203	21	0.1	9.76	11.26	60	PGdelta12-J ₂
333	271	16	0.1	9.76	11.26	60	PGdelta12-J ₂
337	179	17	0.1	9.83	11.33	83	PGB ₂ -d4
337	239	18	0.1	9.83	11.33	83	PGB ₂ -d4
337	319	15	0.1	9.83	11.33	83	PGB ₂ -d4
315	203	23	0.05	13.71	15.21	75	15dPGJ ₂
315	217	22	0.05	13.71	15.21	75	15dPGJ ₂
315	271	29	0.05	13.71	15.21	75	15dPGJ ₂

As análises mostram a produção dos prostanoides da série 2: TXB₂, PGF_{2a}, PGE₂, 13,14dhPGF_{2a}, PGD₂, 15kPGE₂, 13,14dh15kPGF_{2a}, 13,14dh15kPGE₂ e 15dPGJ₂ nas cinco linhagens celulares (figura 12). Os metabólitos PGJ₂ e delta12PGJ₂ não foram detectados em nenhuma das linhagens.

Os gráficos da figura 12 mostram que as cinco linhagens possuem um perfil de produção dos prostanoides com características diferentes, porém em alguns casos podemos observar algumas características similares.

Em relação às diferenças podemos citar, por exemplo, a linhagem U-138MG que foi a única que produziu 15kPGE₂ (metabólito de PGE₂). Outro exemplo ocorreu com a

linhagem U-251MG que não produziu PGF_{2α} e a A172 que também não produziu PGE₂. No caso das linhagens U-138MG, A-172 e U-251MG foi detectado 13,14dhPGF_{2α} (metabólito de PGF_{2α}).

Nas linhagens T98G e A172 o produto 13,14dh15kPGF_{2α} (metabólito de PGF_{2α}) foi detectado. Esses dados demonstram que entre as linhagens analisadas temos um perfil de produção dos prostanoïdes bem diferentes.

Outra constatação do ensaio, foi a ausência dos prostanoïdes da série 1 e série 3 (6kPGF_{1α}, TXB₃, PGE₃, PGF_{1α}, PGD₃, PGE₁, PGD₁, 13,14dh15kPGF_{1α} e 13,14dh15kPGE₁) em qualquer das linhagens.

Em comum observamos a produção do TXB₂, PGD₂ e 15dPGJ₂ nas cinco linhagens. Apesar da produção do TXB₂ e da 15dPGJ₂ terem sido encontradas em concentrações bem diferentes entre si, entre as linhagens a produção de cada uma deles foi bem semelhante.

Estes dados demonstram que a produção dos prostanoïdes da série 2 em relação aos outros prostanoïdes analisados (série 1 e série 3) são importantes no metabolismo do GBM.

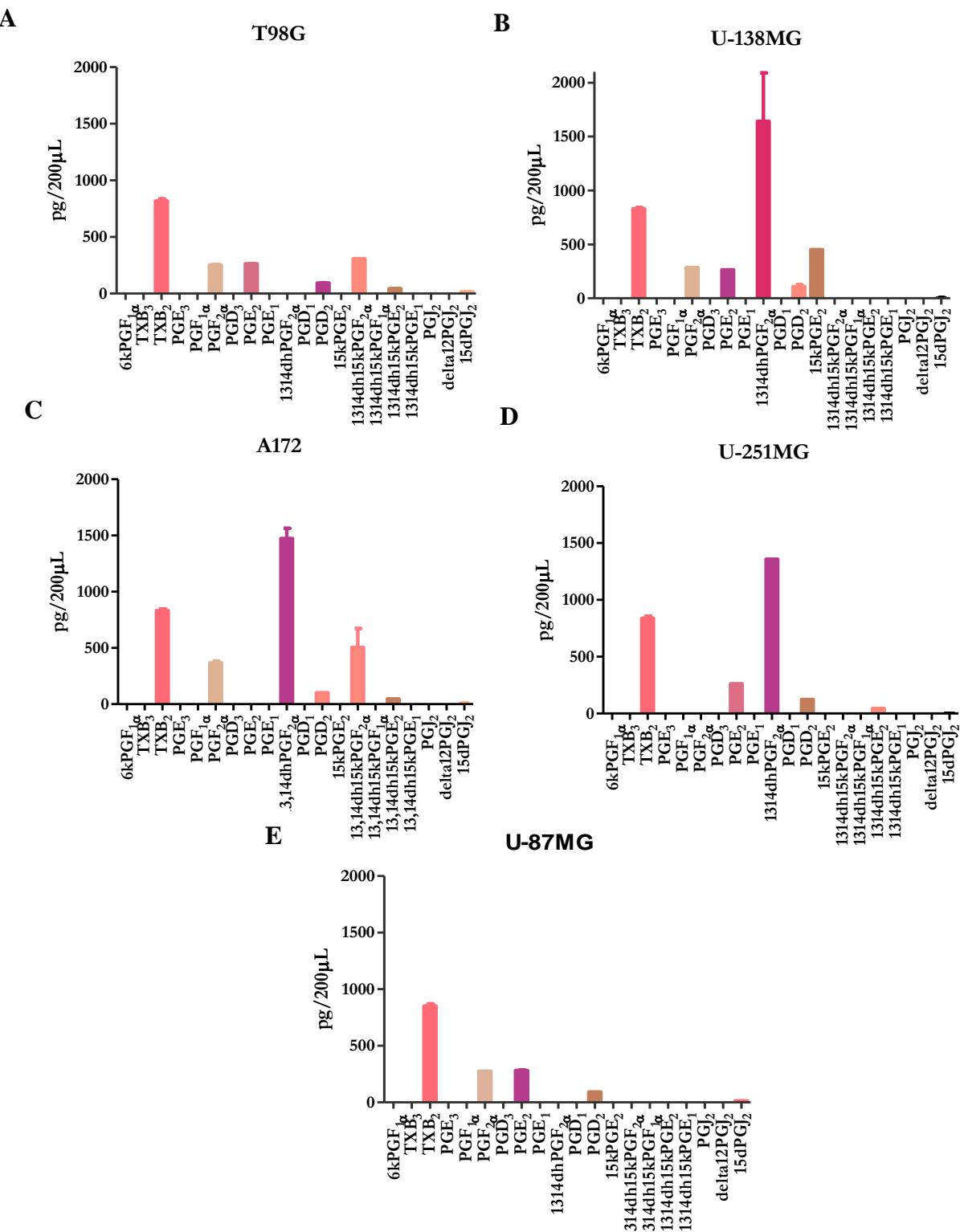


Figura 12 - Análises dos dados de LC\ESI-MS/MS dos produtos 6kPGF_{1α}, TXB₃, TXB₂, PGE₃, PGF_{1α}, PGF_{2α}, PGD₃, PGE₂, PGE₁, 13,14dhPGF_{2α}, PGD₁, PGD₂, 15kPGE₂, 13,14dh15kPGF_{2α}, 13,14dh15kPGF_{1α}, 13,14dh15kPGE₂, 13,14dh15kPGE₁, PGJ₂, delta12PGJ₂, 15dPGJ₂ nas linhagens. (A) T98G. (B) U-138MG. (C) A172. (D) U-251MG. (E) U-87MG. N=3 com injeção em triplicata.

4.5 Migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG

4.5.1 Padronizações das concentrações dos prostanoïdes e dos antagonistas EP2 e EP4

Para determinar quais as concentrações de PGF_{1 α} , PGE_{2 α} , PGD₁, PGD₂, PGE₁, PGE₂, AH6809 e L161.982 que seriam usadas nos ensaios de migrações, foram realizados ensaios de padronizações nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M para os prostanoïdes e de 0,1 μ M, 1 μ M e 10 μ M para os antagonistas.

Através das análises dos dados, foi possível observar que a ação dos tratamentos realizados com os prostanoïdes sobre a migração celular foi significativo nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M em ambas as linhagens. Com esses resultados, escolhemos para os experimentos seguintes a concentração de 5 μ M. Assim teríamos o efeito desejado com a menor concentração (figura 13A e B).

No caso dos antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4 (L161.982) as concentrações significativas foram as de 1 μ M e 10 μ M. Para os experimentos seguintes a concentração escolhida foi de 1 μ M (figura 14A e B).

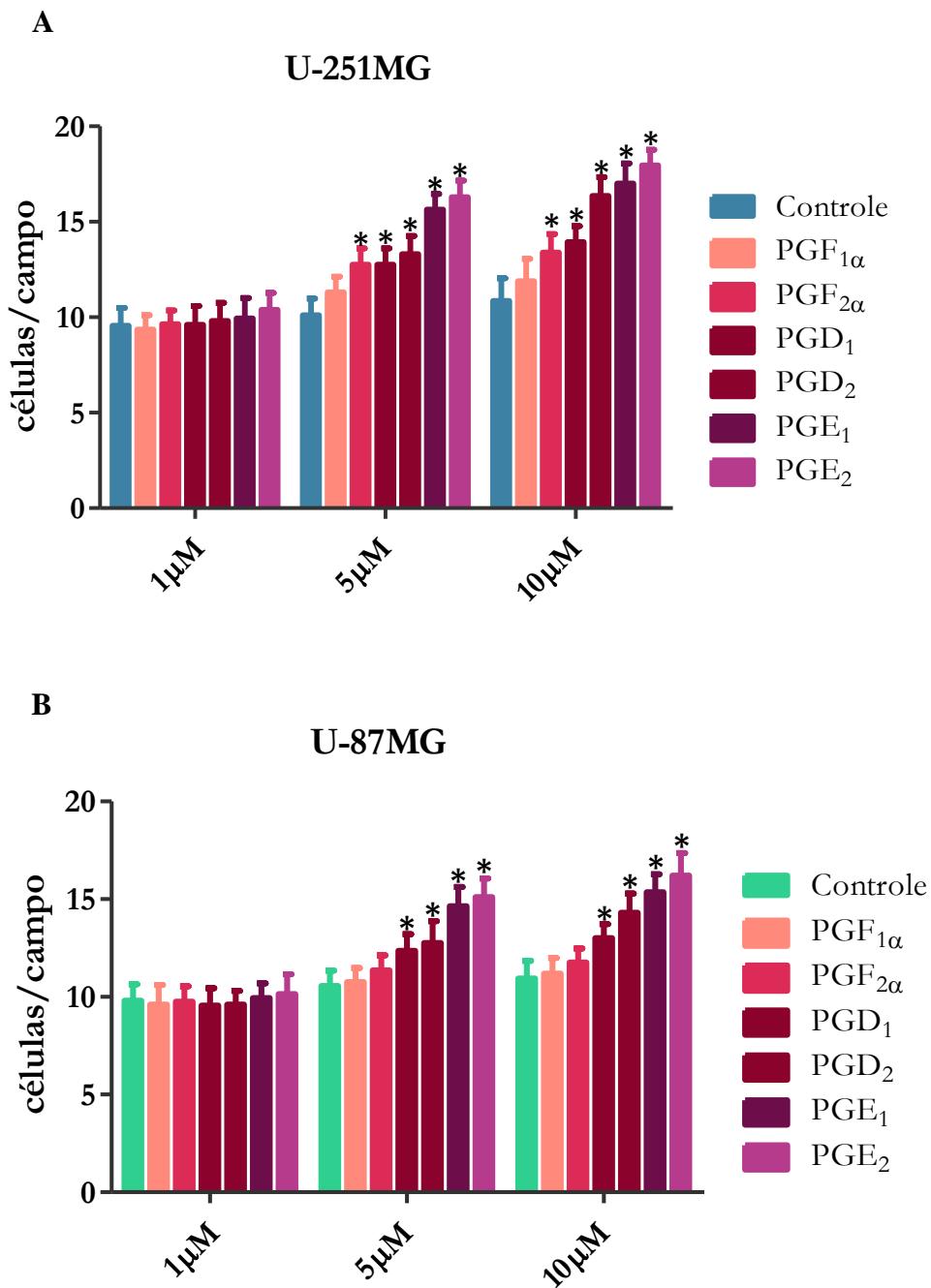


Figura 13 - Curva de concentração dos prostanoïdes nas linhagens U-251MG e U-87MG. **(A)** Capacidade de migração celular da linhagem U-251MG frente aos tratamentos com os prostanoïdes nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M por 12 horas. **(B)** Capacidade de migração celular da linhagem U-87MG frente aos tratamentos com os prostanoïdes nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M por 12 horas. Os resultados experimentais são apresentados como a média \pm erro padrão. Valores significativos para * $p<0,05$ versus controle. Todas as amostras representam N=3 feitos em triplicatas.

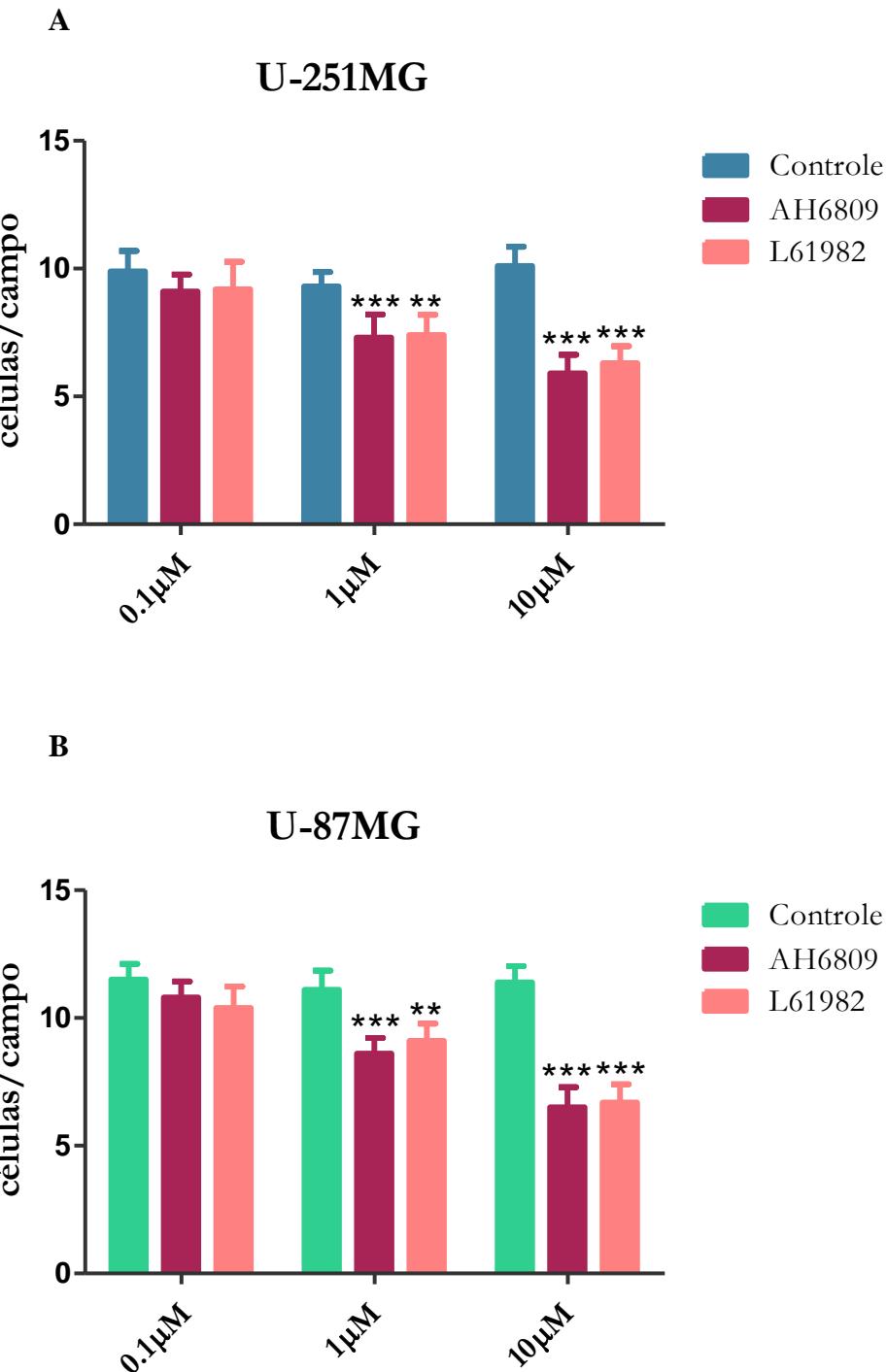


Figura 14 - Curva de concentração dos antagonistas nas linhagens U-251MG e U-87MG. (A) Capacidade de migração celular da linhagem U-251MG frente aos tratamentos com os antagonistas AH6809 e L61982 nas concentrações de 0,1 μM , 1 μM e 10 μM por 12 horas. (B) Capacidade de migração celular da linhagem U-87MG frente aos tratamentos com os antagonistas AH6809 e L61982 nas concentrações de 0,1 μM , 1 μM e 10 μM por 12 horas. Os resultados experimentais são apresentados como a média \pm erro padrão. Valores significativos para * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ versus controle. Todas as amostras representam N=3 feitos em triplicatas.

4.5.2 Migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG tratadas com prostanoïdes

Após a determinação da concentração dos prostanoïdes ($\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGE}_{2\alpha}$, PGD_1 , PGD_2 , PGE_1 , PGE_2), que seriam utilizados, novos ensaios de migrações foram realizados. Os experimentos foram feitos com a adição de 5 μM dos prostanoïdes exógenos por um período de 12 horas nas linhagens de GBM humano U-251 MG e U-87 MG.

Os resultados demonstram na linhagem U-251MG um aumento da capacidade de migração em relação ao controle para os tratamentos realizados com $\text{PGE}_{2\alpha}$, PGD_1 , PGD_2 , PGE_1 e PGE_2 (figura 15). No caso da linhagem U-87MG os tratamentos realizados com PGD_1 , PGD_2 , PGE_1 e PGE_2 também aumentaram a capacidade de migração quando comparada ao seu controle (figura 16). Os dados estatísticos estão demonstrados na Tabela 8.

Para os tratamentos realizados com $\text{PGF}_{1\alpha}$ não foi observada nenhuma diferença significativa em ambas as linhagens. Porém no tratamento com $\text{PGE}_{2\alpha}$ o aumento da migração celular ocorreu apenas da linhagem U-251MG.

Comparando as linhagens, podemos observar de um modo geral que os tratamentos afetaram mais a migração celular das linhagens U-87MG do que a linhagem U-251MG (Tabela 9).

Em ambas as linhagens os dados demonstraram uma influência maior de PGE_1 e PGE_2 quando comparadas aos outros tratamentos

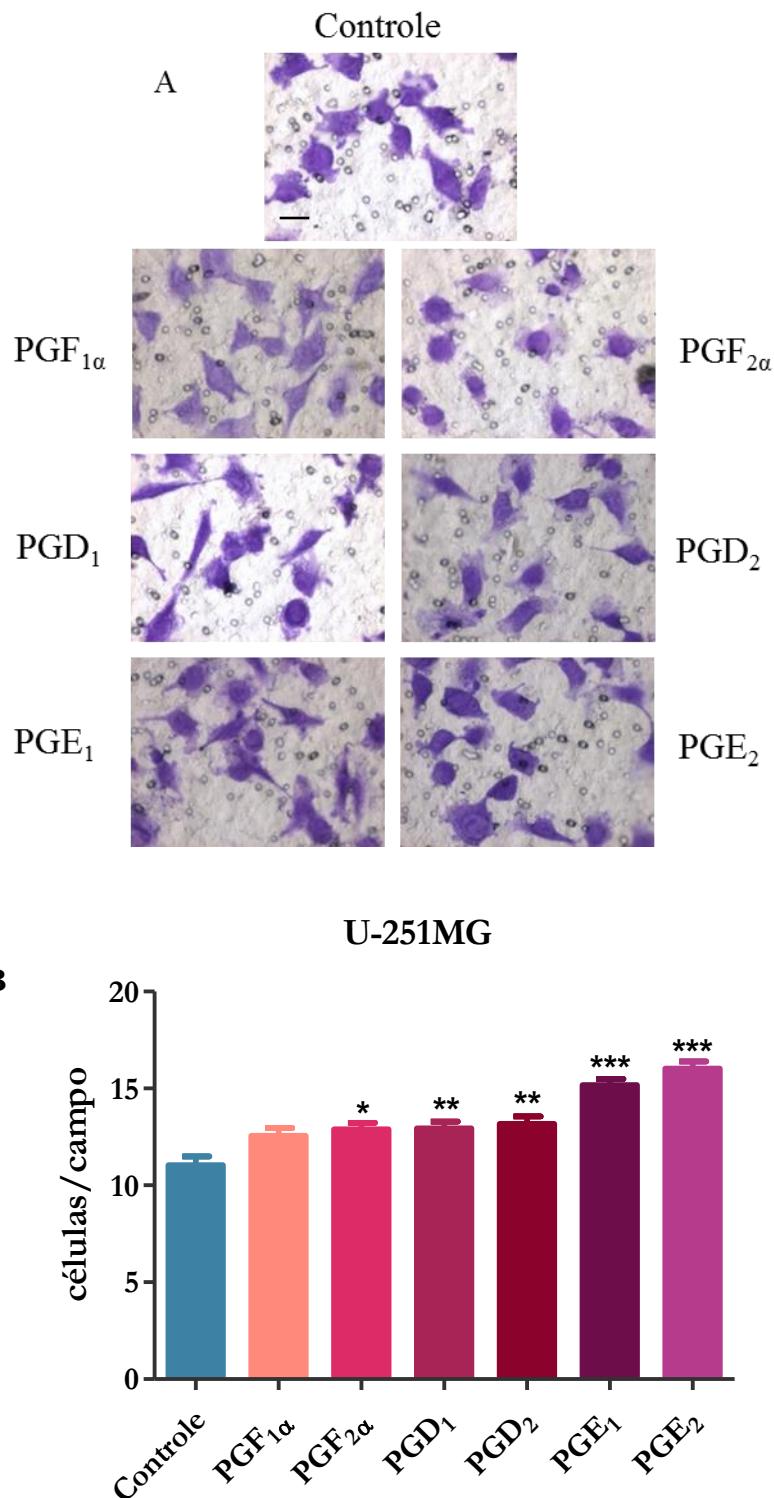


Figura 15 - Efeito dos prostanoïdes ($\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_1 , PGD_2 e PGE_1 , PGE_2) na migração da célula U-251MG. (A) Imagens representativas de células que migraram coradas com cristal de violeta. (B) Gráfico com o número de células que migram na presença ou ausência de $5 \mu\text{M}$ $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_1 , PGD_2 e PGE_1 , PGE_2 . Os resultados experimentais são apresentados como a média \pm erro padrão. Valores significativos para $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ versus controle. Todas as amostras representam $N=3$ feitos em triplicatas. Barra de escala = $30 \mu\text{M}$.

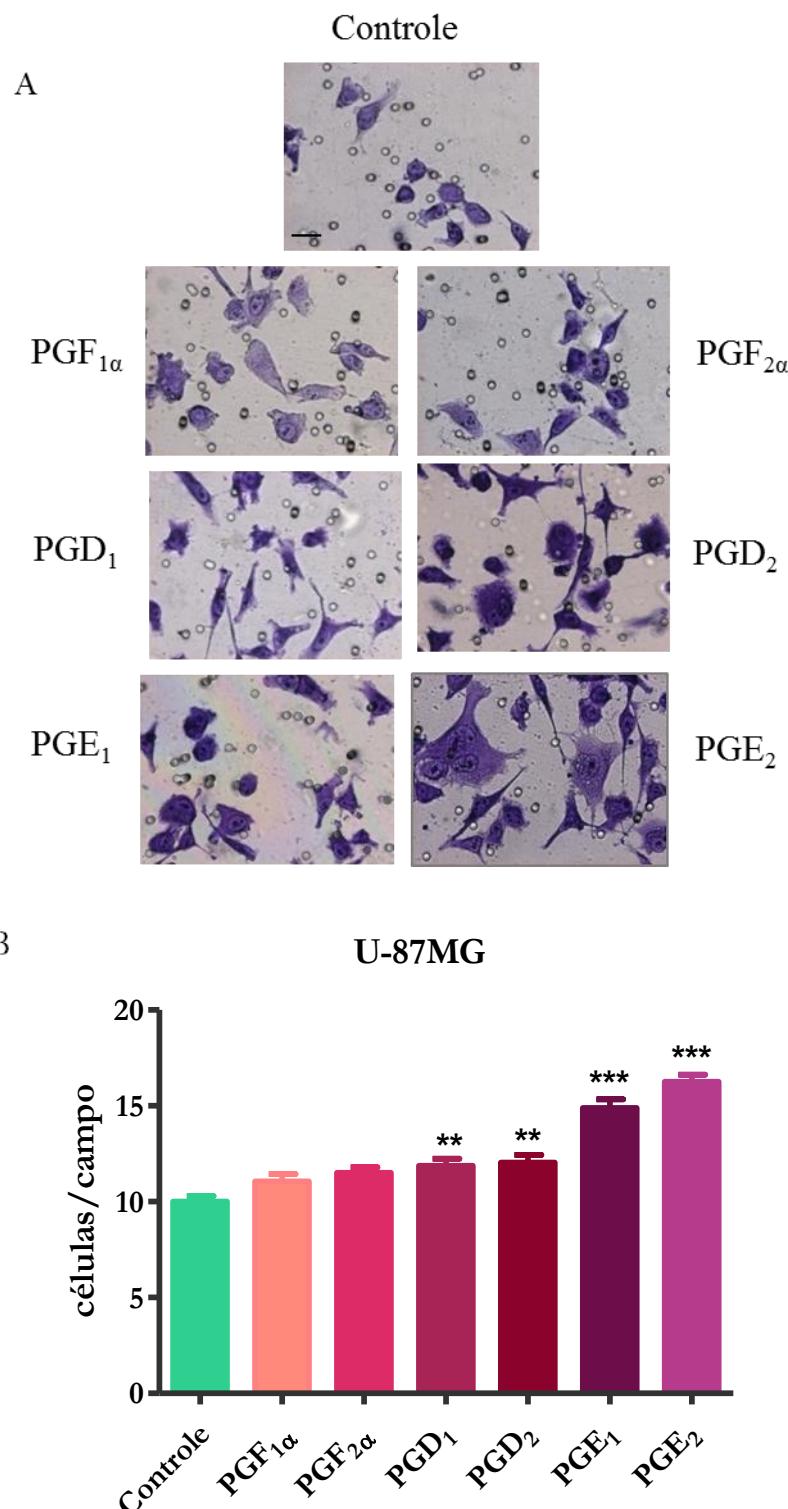


Figura 16 - Efeito dos prostanoïdes (PGF_{1α}, PGF_{2α}, PGD₁, PGD₂ e PGE₁, PGE₂) na migração da célula U-87 MG. (A) Imagens representativas de células que migraram coradas com cristal de violeta. (B) Gráfico com o número de células que migram na ausência ou presença de 5 μM 5 μM PGF_{1α}, PGF_{2α}, PGD₁, PGD₂ e PGE₁, PGE₂. Os resultados experimentais são apresentados como a média ± erro padrão. Valores significativos para *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 versus controle. Todas as amostras representam N=3 feitos em triplicatas. Barra de escala =30 μM.

Tabela 8 - Relações estatísticas dos prostanoïdes na migração.

Relações	U-251MG	U-87MG	Relações	U-251MG	U-87MG
Cont vs PGF_{1α}	ns	ns	PGF_{1α} vs PGE₂	***	***
Cont vs PGF_{2α}	*	ns	PGF_{2α} vs PGD₁	ns	ns
Cont vs PGD₁	**	**	PGF_{2α} vs PGD₂	ns	ns
Cont vs PGD₂	**	**	PGF_{2α} vs PGE₁	***	***
Contr vs PGE₁	***	***	PGF_{2α} vs PGE₂	***	***
Contr vs PGE₂	***	***	PGD₁ vs PGD₂	ns	ns
PGF_{1α} vs PGF_{2α}	ns	ns	PGD₁ vs PGE₁	**	***
PGF_{1α} vs PGD₁	ns	ns	PGD₁ vs PGE₂	***	***
PGF_{1α} vs PGD₂	ns	ns	PGD₂ vs PGE₁	**	***
PGF_{1α} vs PGE₁	***	***	PGD₂ vs PGE₂	***	***
PGF_{1α} vs PGE₂	***	***	PGE₁ vs PGE₂	ns	ns

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Tabela 9 - Resultados dos tratamentos dos realizados com os prostanoïdes na migração.

Prostanoide	U-251MG	U-87MG.
PGF_{1α}	-	-
PGF_{2α}	↑ 16%	-
PGD₁	↑ 17%	↑ 18%
PGD₂	↑ 19%	↑ 21%
PGE₁	↑ 38%	↑ 49%
PGE₂	↑ 45%	↑ 62%

4.5.3 Migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG tratadas com os antagonistas de EP2 (AH6809) e EP4 (L161.982)

Com base nos resultados demonstrados acima, decidimos verificar se o processo de migração celular é dependente dos receptores EP2 e EP4, uma vez que PGE₂ exerce suas funções biológicas através de seus receptores. Para isso, utilizamos a inibição farmacológica, com antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4 (L161.982).

AH6809 é um antagonista dos receptores EP e DP, com igual afinidade para EP1, EP2, EP3-III e DP1. Já o L161.982 é um antagonista seletivo apenas do receptor EP4.

Apesar do antagonista AH6809 reconhecer diferentes receptores, isso não foi um problema para os nossos estudos, pois foi visto no trabalho de Feitoza (2013), que as linhagens U-251 MG e U-87 MG não expressam os receptores EP1 e EP3. Em relação a DP1, no trabalho de Ferreira (2014), foi demonstrado que as linhagens U-251MG e U-87MG também não expressam esse receptor. Sendo assim, utilizamos esse antagonista com segurança.

Os resultados demonstraram na linhagem U-251MG que tanto o tratamento realizado com o antagonista do receptor EP2 (AH6809), quanto o tratamento realizado com o antagonista do receptor EP4 (L161.982) diminuíram a capacidade de migração das células. No tratamento realizado com 1 µM de AH6809 a redução da migração foi de 18%, enquanto que a redução para o tratamento de 1 µM de L161.982 foi de 11% (figura 17).

Para a linhagem U-87MG os efeitos obtidos na migração em ambos os tratamentos foram muito similar com os obtidos na linhagem U-251MG. No tratamento com 1 µM de AH6809 a redução da migração foi de 16%, enquanto que com o tratamento de 1 µM de L161.982 a redução foi de 12% (figura 18) (Tabela 9).

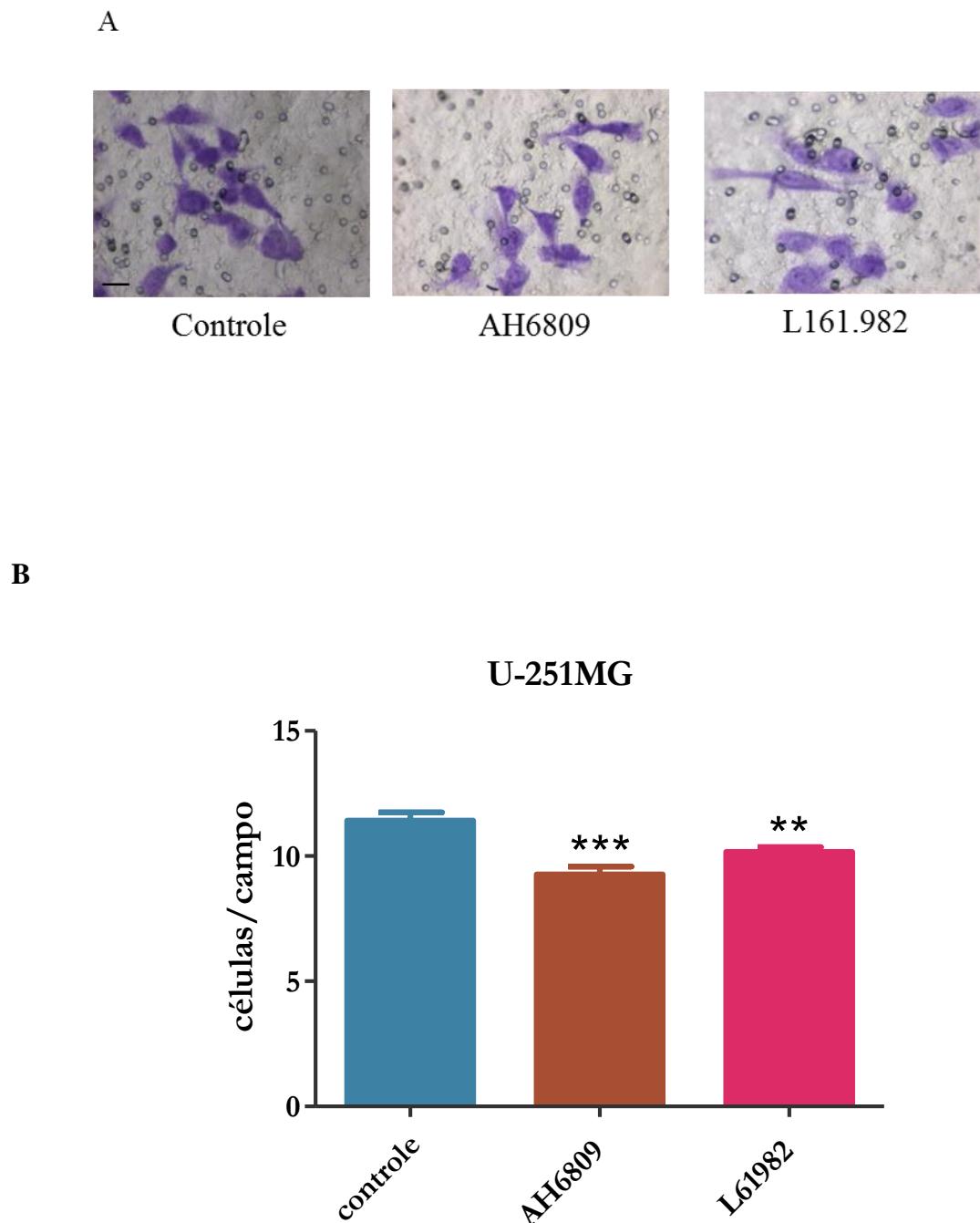


Figura 17 - Efeito dos antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4(L161982) na migração da célula U-251MG. **(A)** Imagens representativas de células que migraram coradas com cristal de violeta de cristal. **(B)** Gráfico com o número de células que migram na ausência ou presença de 1 μ M dos antagonistas de EP2 (AH6809) e EP4 (L161.982) por 12 horas. Os resultados experimentais são apresentados como a média \pm erro padrão. Valores significativos para * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ versus controle. Todas as amostras representam N=3 feitos em triplicatas. Barra de escala= 30 μ M.

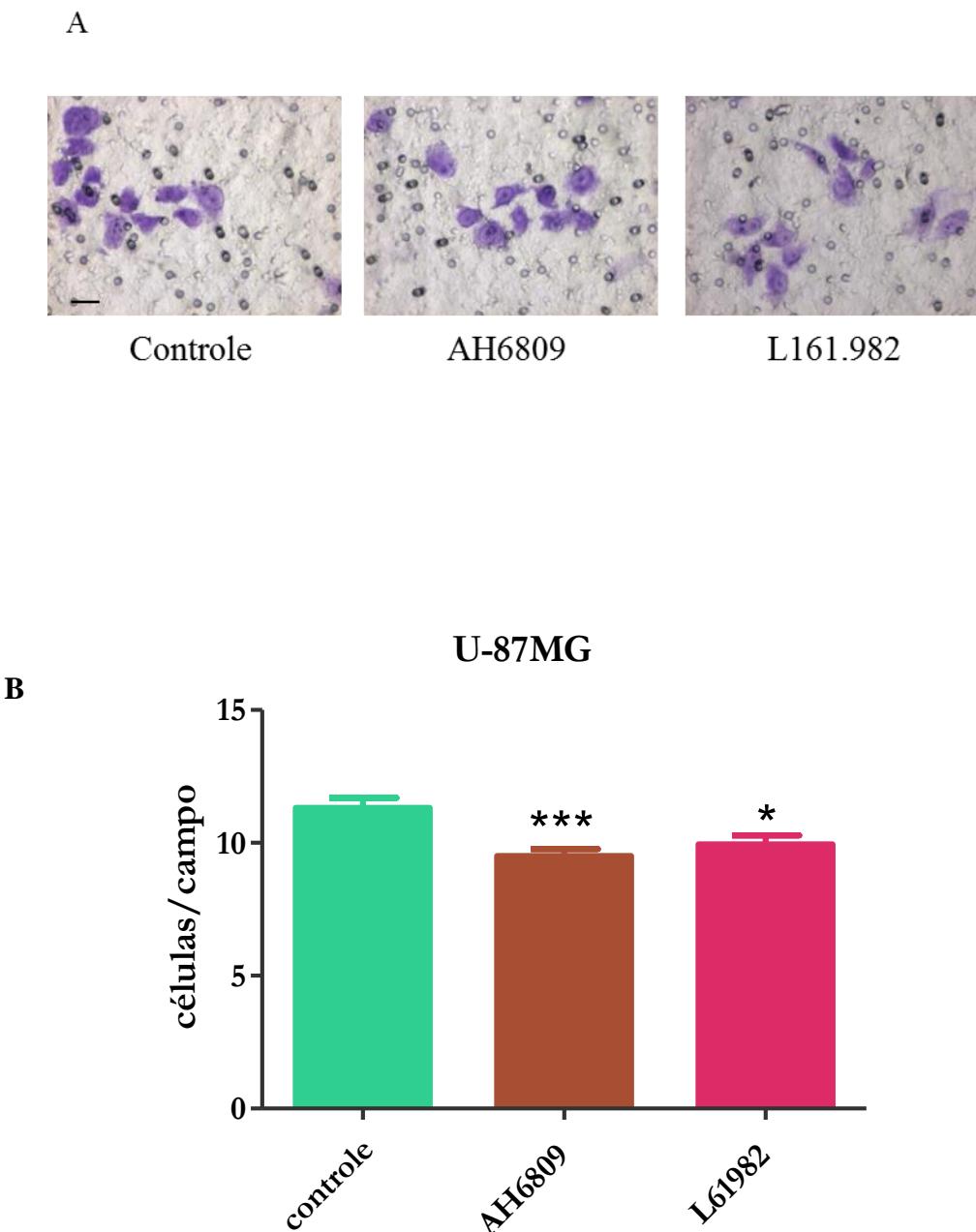


Figura 18 - Efeito dos antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4(L161982) na migração da célula U-87MG. **(A)** Imagens representativas de células que migraram coradas com cristal de violeta. **(B)** Gráfico com o número de células que migram na ausência ou presença de 1 μ M dos antagonistas de EP2 (AH6809) e EP4 (L161.982) por 12 hora. Os resultados experimentais são apresentados como a média \pm erro padrão. Valores significativos para * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ versus controle. Todas as amostras representam N=3 feitos em triplicatas. Barra da escala=30 μ M.

4.5.4 Migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG tratadas com os antagonistas de EP2 (AH6809) e EP4 (L161.982) e PGE₂ exógena.

Para elucidar a hipótese de que o efeito de PGE₂ nas linhagens de GBM eram dependente dos receptores EP2 e EP4, realizamos ensaio de migração com a inibição dos receptores EP2 e/ou EP4 (1 µM), além da adição exógena de PGE₂ (5 µM).

A diferença desse experimento para o anterior está relacionada à quantidade de PGE₂. Diferente do experimento anterior, aonde não houve a adição exógena de PGE₂ e sim uma pequena quantidade de PGE₂ encontrado no SFB do meio de cultura. Este experimento além da pequena quantidade de PGE₂ encontrado no SFB, houve também a adição de PGE₂ exógeno.

Observou-se pelos resultados que os tratamentos realizado com o antagonista do receptor EP2 (AH6809) e PGE₂ exógeno, não tiveram diferenças significativas em relação aos seus controles em ambas as linhagens. Para o tratamento realizado com o antagonista do receptor EP4 (L161.982) e PGE₂ também não foram observadas diferenças em ambas as linhagens, quando comparadas com seus respectivos controles.

Esse dados mostraram que a inibição simultânea dos receptores EP2 e EP4 é capaz de reverter à diminuição da migração induzida pelo tratamento com PGE₂. Outro fato importante constatado foi de que a inibição de apenas um dos receptores (EP2 ou EP4) não foi suficiente para anular o papel de PGE₂ na migração celular, indicando que ambos os receptores (EP2 ou EP4) são igualmente importante para este processo.

No caso do tratamento realizado com os antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4 (L161.982) mais a adição de PGE₂, observamos uma diminuição da migração celular de 23% na linhagem U-251MG (figura 19) e de 14% na linhagem U-87MG (figura 20) (Tabela 11).

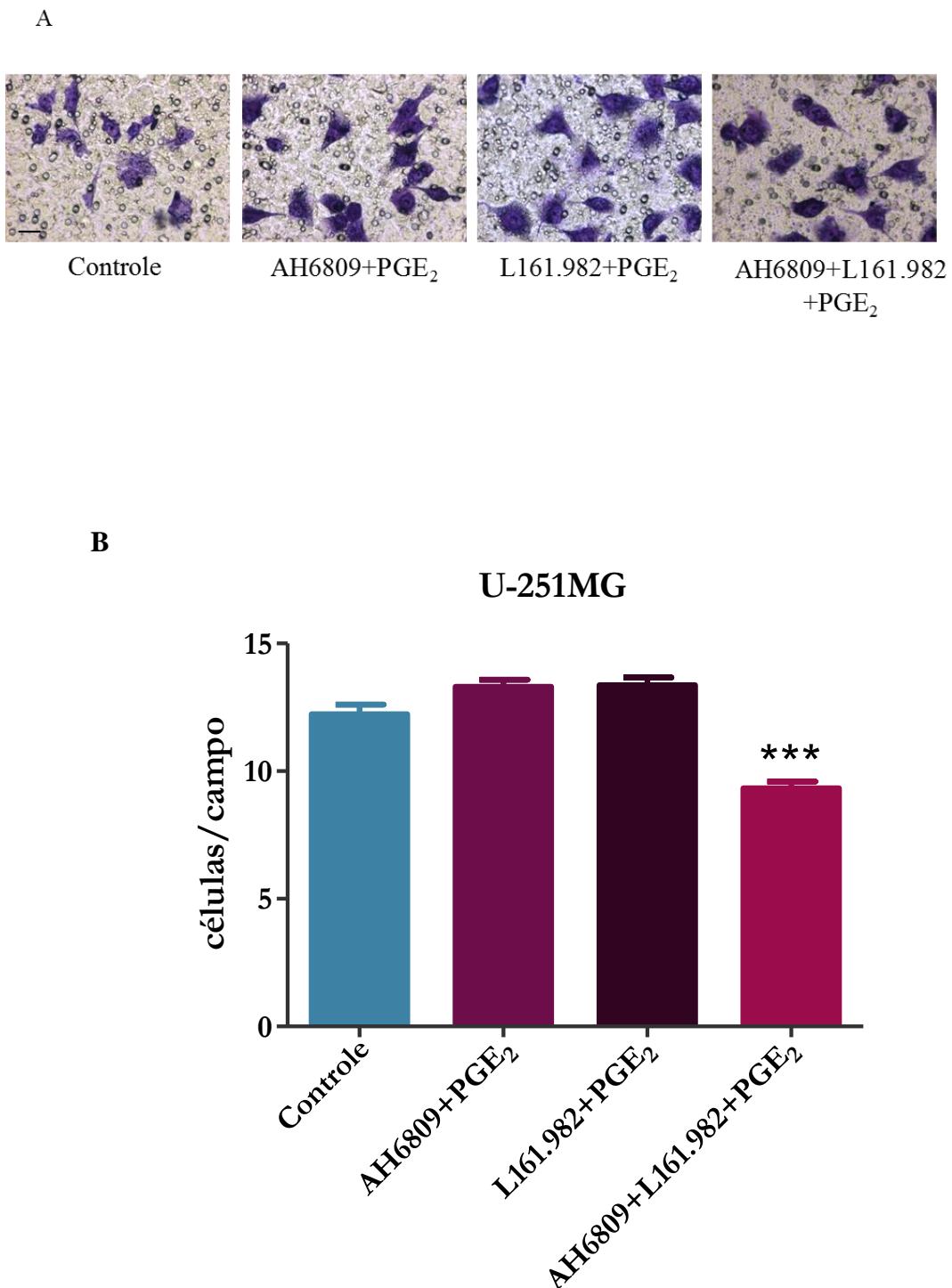


Figura 19 - Efeito dos antagonistas dos receptores (EP2 e EP4) e PGE₂ na migração das células U-251MG. **(A)** Imagens representativas de células que migraram coradas com cristal de violeta. **(B)** Gráfico com o número de células que migraram na ausência ou presença de 1 μ M AH6809 + 5 μ M PGE₂, 1 μ M L161982 + 5 μ M PGE₂, e 1 μ M EP2 + 1 μ M EP2 + 5 μ M PGE₂ por 12 horas. Os resultados experimentais são apresentados como a média \pm erro padrão. Valores significativos para * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ versus controle. Todas as amostras representam N=3 feitos em triplicatas. Barra da escala= 30 μ M.

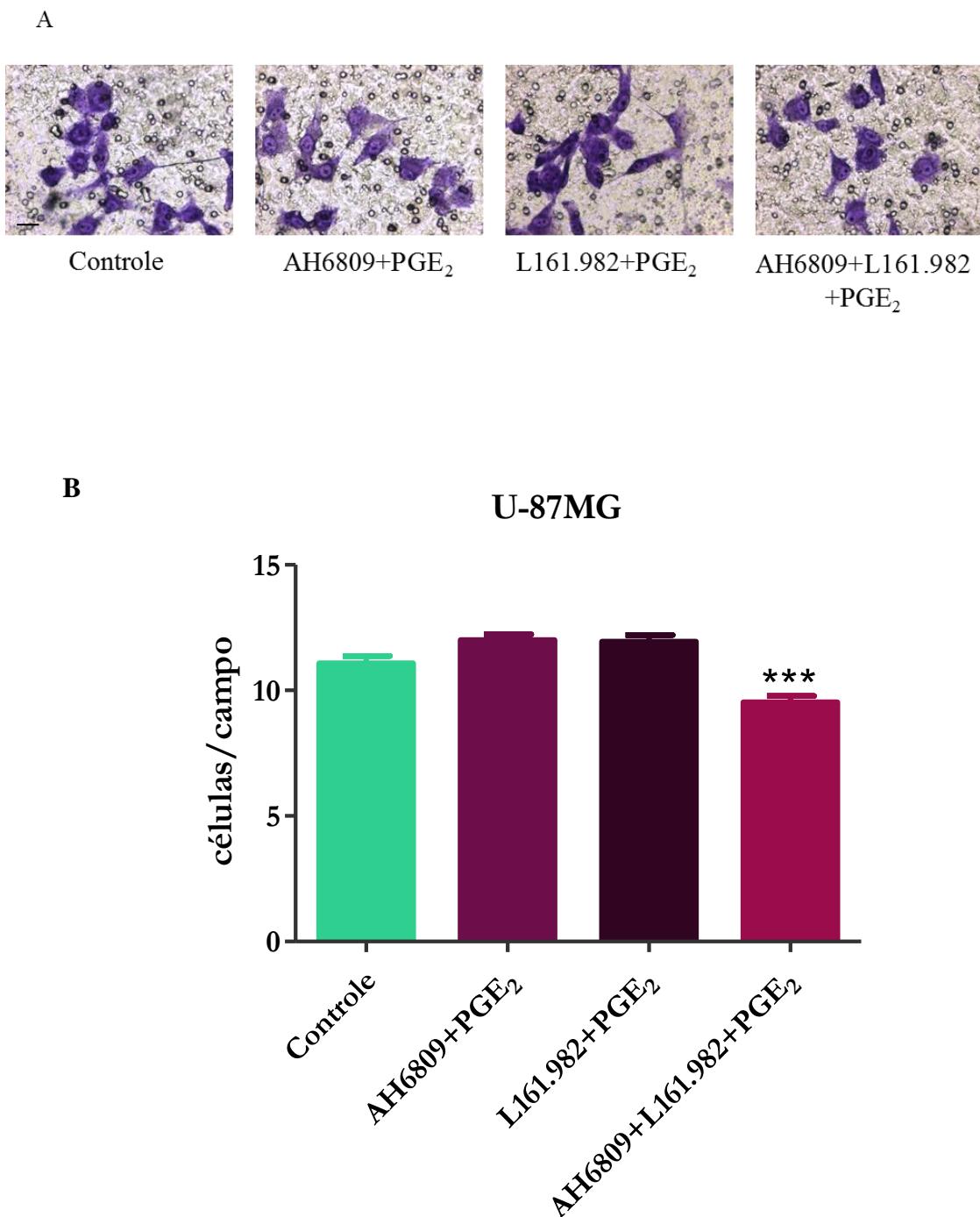


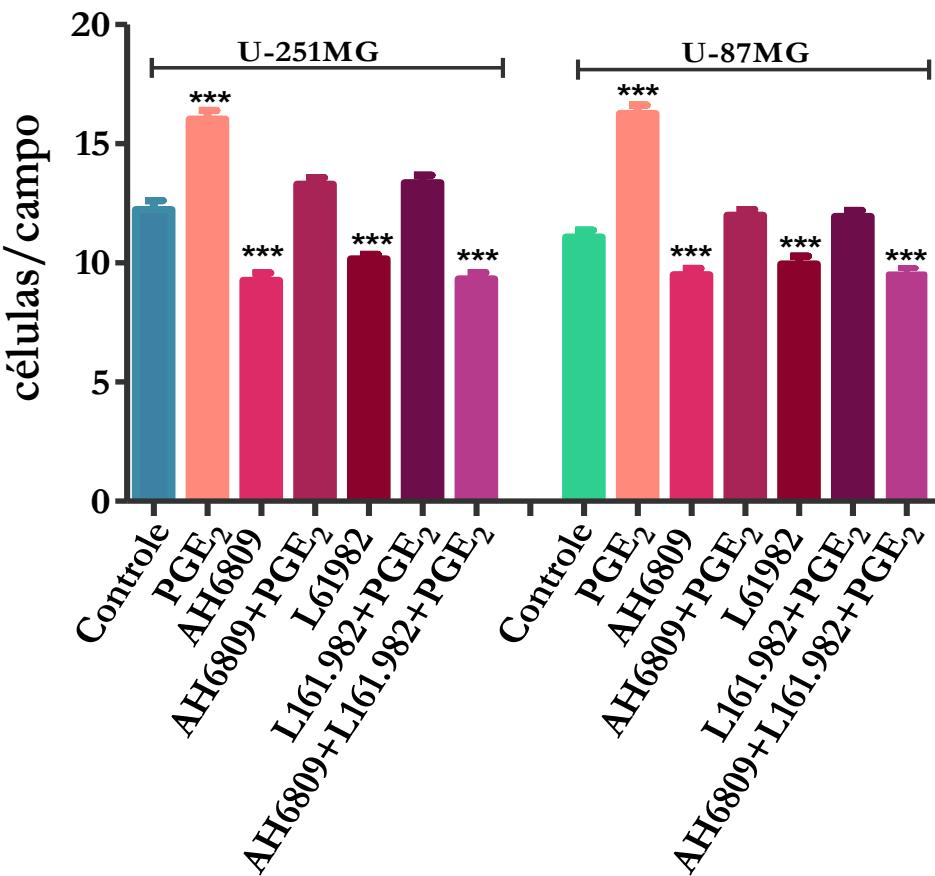
Figura 20 - Efeito dos antagonistas dos receptores (EP2 e EP4) e PGE₂ na migração das células U-87MG. **(A)** Imagens representativas de células que migraram coradas com cristal de violeta. **(B)** Gráfico com o número de células que migram na ausência ou presença de 1 μ M AH6809 + 5 μ M PGE₂, 1 μ M L161982 + 5 μ M PGE₂, e 1 μ M EP2 + 1 μ M EP2 + 5 μ M PGE₂ por 12 horas. Os resultados experimentais são apresentados como a média \pm erro padrão. Valores significativos para * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ versus controle. Todas as amostras representam N=3 feitos em triplicatas. Barra da escala=30 μ M.

Tabela 10 - Resultados dos tratamentos realizados com antagonistas na migração.

Linhagem	AH6809	L161.982
U-251MG	↓ 18%	↓ 11%
U-87MG	↓ 16%	↓ 12%

Tabela 11 - Resultados dos tratamentos realizados com antagonistas e PGE₂ na migração.

Linhagem	AH6809+PGE ₂	L161.982+PGE ₂	AH6809+L161.982+PGE ₂
U-251MG	-	-	↓ 23%
U-87MG	-	-	↓ 14%

**Figura 21** - Efeito de PGE₂ e os antagonistas dos receptores (EP2 e EP4) na migração das células U-251MG e U-87MG. Os resultados experimentais são apresentados como a média ± erro padrão. Valores significativos para *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 versus controle. Todas as amostras representam N=3 feitos em triplicatas.

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise da expressão gênica e proteica

A síntese dos prostanoïdes é importante na patogênese e progressão do câncer, pois os metabólitos do AA afetam vários comportamentos celulares importantes, tais como proliferação, adesão celular, invasão e apoptose. Além disso, em vários tipos de tumores os níveis de síntese desses prostanoïdes é muito superior quando comparado ao tecido normal.

Os prostanoïdes são produzidos através de uma complexa cascata enzimática, da qual participam as ciclooxigenases, sintases e receptores. A via de síntese dos prostanoïdes dá origem a: PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF_{2α} e TXA₂, que estão de alguma forma envolvida no desenvolvimento e progressão do tumor (Mutoh et al., 2006). PGE₂ é considerada como o prostanoïde mais importante entre as prostaglandinas da série 2, sendo detectada em tumores de cólon, de estômago, fígado, próstata, mama, pulmão e pele (Buckman et al., 1998; Hwang et al., 1998; Koga et al., 1999; Uefuji et al., 1998; Wolff et al., 1998; Yoshimura et al., 2000). No cérebro, PGE₂ é quantitativamente a prostaglandina mais sintetizada, participando de vários processos cerebrais importantes (Chen, Bazan, 2005).

A elucidação dos componentes da via de sinalização dos prostanoïdes bem como suas funções em condições fisiológicas e patológicas, vem sendo alvo frequente de investigação nas ultima décadas.

Buscando elucidar o perfil de expressão gênica e proteica de genes envolvidos na via de biossíntese de PGE₂, avaliamos as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), sintases (mPGES1, mPGES2 e cPGES), receptores (EP2 e EP4) e a via de degradação (PGT e 15-HPGD) nas linhagens U-251MG e U-87MG.

Nossos resultados mostraram que em ambas as linhagens foram encontradas a expressão de todos os genes e proteínas analisados. De um modo geral o perfil de expressão dos genes nas células U-251MG e U-87MG foram bem heterogêneos, com exceção da sintase cPGES que apresentou um perfil de expressão muito semelhante nas duas linhagens.

Analisando separadamente a expressão de cada gene, vimos que na linhagem U-251MG a expressão da COX-1 e COX-2 foram muito semelhantes entre si, enquanto que na linhagem U-87MG tivemos uma maior expressão da COX-2 em relação a COX-

1. Em relação a imunofluorescência, vimos uma forte marcação para COX-1 e fraca marcação para COX-2 para ambas as linhagens.

As ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) são enzimas que estão envolvidas na síntese dos prostanoides usando ácidos graxos da membrana como substrato. A expressão alterada das COXs, especialmente da COX-2, está associada com o aumento dos níveis de seu principal produto metabólico, a PGE₂ (Greenhough et al., 2009).

Em GBM, estudos anteriores demonstraram que COX-2 está correlacionada diretamente com o grau de glioma e com a menor sobrevida de pacientes com GBM (Shono et al., 2001). Além disso, evidências recentes indicam que a COX-2 é essencial para os processos de invasão e proliferação de GBM, o que sugere um papel crítico da COX-2 na iniciação e desenvolvimento de GBM (Sharma et al., 2011; Xu et al., 2014).

Estudos realizados por Joki et al., (2002) avaliaram por imunohistoquímica a expressão de COX-2 em 50 amostras de glioma, sendo que 25 dessas amostras eram de pacientes com GBM. Os resultados mostraram que todas as 50 amostras avaliadas apresentaram a expressão de COX-2. Porém nas amostras de GBM a expressão da COX-2 foi mais elevada quanto comparada com gliomas de baixo grau analisados.

De um modo semelhante Prayson et al., (2002), também avaliou a expressão de COX-2 em 47 amostras de GBM. Das 47 amostras de tumores analisadas, 75% apresentaram uma elevada expressão de COX-2. Neste trabalho a expressão aumentada de COX-2 foi associada às altas taxas de proliferação do GBM.

No caso da COX-1, por muito tempo, a expressão dessa ciclooxigenase em tumores, foi secundária em comparação a COX-2. Muitos dos estudos que avaliaram a expressão de COX-2 nos tumores, não avaliaram a expressão da COX-1, devido ao pressuposto de que COX-1 é um gene constitutivo. Porém no trabalho de Osman, Youssef (2015) observou uma alta expressão de COX-1 em 62,5% dos tecidos de câncer renal (RCC). Sendo que a expressão da COX-1 foi progressivamente aumentando a partir do tecido renal normal na direção dos graus I-II-III e IV do carcinoma. Em outros trabalhos também foram vistos uma correlação estatística significativa entre a ativação de COX-1 e a progressão de tumores como carcinoma de nasofaringe, melanoma (Yoshimoto et al., 2005), câncer de mama (Hwang et al., 1998), ovário (Freedman et al., 2007; Gupta et al., 2003), pulmão (Bauer et al., 2000), cervical câncer e colo do útero (Sales et al., 2002).

No trabalho desenvolvido por Wilson et al., (2015) foi visto em diferentes linhagens tumorais, incluindo GBM, uma expressão mais elevada do mRNA de COX-1

em comparação a expressão de COX-2. Em outros trabalhos realizados no laboratório, Panagopoulos (2013), observou em amostras de GBM uma maior expressão da COX-1 e COX-2 em relação à gliomas de baixo grau.

Esses dados apresentados só reforçam os dados obtidos neste trabalho, que mostram que ambas as ciclooxygenases além de serem expressas em GBM, são importantes para o desenvolvimento do tumor. Porém sozinhas essas ciclooxygenases não são capazes de produzir PGE₂.

PGE sintases (PGES) agem de forma *downstream* as ciclooxygenases e catalisam a conversão de PGH₂ para PGE₂. Existem três isoformas distintas conhecidas das sintases denominadas como: PGES, mPGES1 e mPGES2 (Park et al., 2006). Destas sintases, cPGES e mPGES2 são constitutivamente expresso, enquanto que a mPGES1 é induzida (Samuel et al., 2007).

Entre as três sintases a mPGES1 é a mais estudada e está diretamente associada com o aumento da produção de PGE₂, em vários tipos de canceres incluindo os tumores cerebrais (Mattila et al., 2009).

No trabalho de Murakami et al., (2000), foi demonstrado que a expressão aumentada de COX-2 e mPGES1 na linhagem HEK-293 (rim) aumentou o processo de proliferação celular da linhagem. Além disso, a expressão aumentada de COX-2 e mPGES1 na mesma linhagem foi responsável pela formação de tumores grandes e bem vascularizados, quando injetado nos flancos de ratos nudes. No mesmo trabalho, o tratamento de células HCA-7 com o inibidor de mPGES1 (CAY10526), diminuiu a produção de PGE₂ e atenuou a proliferação das células, ao passo que a expressão aumentada de mPGES1 aumentou a produção de PGE₂ e a proliferação celular (Kamei et al., 2003).

Outros trabalhos mostraram nas linhagens tumorais, A549 (pulmão) e DU145 (próstata), que o silenciamento da mPGES1 causou uma diminuição da capacidade clonogênico, além de diminuir a capacidade de crescimento dos tumores (Hanaka et al., 2009). Da mesma forma, Kamei et al., (2009) mostrou que o silenciamento da mPGES1 em carcinoma de pulmão de Lewis, diminui a proliferação celular, além de reduzir a invasão e aumentar adesão da matriz extracelular.

Recentemente, Seo et al., (2009) relatou que a expressão de mPGES2 em câncer de colorretal, foi significativamente mais elevado nas amostras de tumor do que nas amostras do epitélio normal adjacente. Em biópsias de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CECP), foi mostrado uma expressão aumentada

de COX-2 e cPGES, cerca de 4 e 2,5 vezes respectivamente, em comparação ao tecido normal (Camacho et al., 2008).

Em outros estudos a expressão de mPGES1, mPGES2, e cPGES foram avaliados por imunohistoquímica em 129 amostras de pacientes com câncer gástrico. A expressão das três sintases foram encontradas em 47% das amostras analisadas, enquanto que em tecidos normais apenas as sintases mPGES1 e mPGES2 foram encontradas (Gudis et al., 2007).

Em tumores cerebrais a expressão de altos níveis de mPGES1, mPGES2 e cPGES foi observado por imunohistoquímica em amostras de neuroblastoma e gliomas. Em ambos os casos a expressão aumentada dessas sintases correspondeu a um prognóstico ruim dos pacientes (Larsson et al., 2015; Mattila et al., 2009).

Nossos dados mostraram pela primeira vez uma maior expressão da sintase cPGES em relação a mPGES1 e mPGES2 em ambas as linhagens de GBM. A literatura mostra que a cPGES de um modo geral liga-se preferencialmente à COX-1 para promover a produção de PGE₂. Isso confirma mais uma vez a importância de COX-1 para a produção de PGE₂ em GBM, além de mostrar um possível papel de cPGES no processo tumoral.

Outro dado observado foi a maior expressão de mPGES1 em comparação com mPGES2 na linhagem U-87MG. Esses dados são interessantes porque para promover a biossíntese de PGE₂, a mPGES1 necessita estar ligada preferencialmente a COX-2 e como vimos anteriormente na U-87MG ocorreu uma maior expressão de COX-2 em relação a COX-1. No caso da U-251MG a expressão de ambas as sintases mPGES1 e mPGES2 foram muito semelhantes, assim como a expressão da COX-1 e COX-2.

Na imunofluorescência observamos apenas uma forte marcação para a mPGES2 em ambas as linhagens, enquanto que na mPGES1 tivemos uma fraca marcação para U-251MG e forte marcação para U-87MG.

Em relação a cPGES observamos uma fraca marcação para a linhagem U-87MG e nenhuma marcação para U-251 MG. Esses dados da não detecção da proteína cPGES pode estar relacionados a qualidade do anticorpo utilizado, pois em trabalhos anteriores do laboratório não foi detectado a marcação de cPGES em amostras controle.

Com esse trabalho, demonstramos que de forma geral todas as sintases possivelmente estão envolvidas na produção de PGE₂ nas linhagens U-87MG e U-251MG. Além disso, podemos sugerir que coletivamente a expressão aumentada das

sintases em combinação com as ciclooxigenases podem contribuir com a progressão do câncer.

Sob condições normais, PGE₂ regula várias funções através da ligação com seus receptores EP, classificados como EP1, EP2, EP3, EP4, onde cada um dos seus receptores tem uma função bioquímica distinta (Sugimoto et al., 2007; Wang et al., 2007;). Trabalhos envolvendo os receptores mostram que as expressões de certos EPs podem influenciar na capacidade de crescimento, invasão e angiogênese dos tumores de pulmão, cólon, próstata e pele (Amano et al., 2003; Fulton et al., 2006; Huang et al., 2013).

No trabalho de Payner et al., (2006) análises feitas por western blot na linhagem U87-MG mostraram uma maior expressão de EP2 e EP4 em comparação aos astrócitos de cultura primária. Em outro trabalho realizado por Fiebich et al., (2001) apenas os mRNA dos receptores EP2 e EP4 foram encontrados na linhagem U-373MG (GBM) e em culturas primárias de astrócitos de rato.

Utilizando cultura primária de amostras de GBM Brocard et al., (2015), mostrou que através do receptor EP2, PGE₂ foi capaz de aumentar a sobrevivência e proliferação das células. Raza et al., (2004) também constatou uma expressão elevada de EP4 em 15 amostras de tecidos de GBM em comparação a 5 astrocitoma anaplásico. Esses dados foram semelhantes aos encontrados neste trabalho, aonde obtivemos por qRT-PCR a expressão apenas de EP2 e EP4 nas linhagens U-251MG e U-87MG. Porém em ambas as linhagens a expressão do receptor EP2 foi mais elevada em comparação a expressão de EP4, sendo que na U-87MG isso fica mais evidente.

Na imunofluorescência a marcação de ambos os receptores (EP2 e EP4) foram forte nas duas linhagens. Esses dados em conjunto sugerem que a ativação de EP2 e EP4 é um componente importante na progressão de GBM.

Atualmente, os membros envolvidos na via de transporte e degradação de PGE₂ estão ganhando cada vez mais atenção, uma vez que os efeitos pró-carcinogêneos de PGE₂ não são regulados apenas pela sua biossíntese, mas também pela sua degradação.

A internalização e a inativação de PGE₂ são realizadas por duas proteínas distintas. PGE₂ é transportada para o interior das células através de PGT e subsequentemente oxidada a 15-ceto-PGE₂ pela 15-PGDH. Ambas as etapas são necessárias para a inativação eficiente de PGE₂ (Nomura et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que a expressão de PGT e 15-PGDH estão frequentemente reduzidas em várias neoplasias, insinuando que as alterações nos níveis

de PGE₂ podem ter um papel importante no desenvolvimento do tumor (Holla et al., 2008; Ichikawa et al., 1996;).

Em câncer de mama a análise da expressão de 15-PGDH por qRT-PCR e western blot nas linhagens celulares MCF-7, T-47D, BT-474, ZR75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SK-BR-3 e BT-20 revelou uma baixa expressão em todas as linhagens (Wolf et al., 2006). Em neuroblastoma de alto grau foi identificado uma baixa expressão de 15-PGDH e consequentemente altos níveis de PGE₂ quando comparado com neuroblastomas de baixos graus (Larsson et al., 2015).

No entanto, os estudos envolvendo 15-PGDH em GBM são limitados. Wakimoto et al. (1998), mostrou pela primeira vez, a influência de 15-PGDH no crescimento celular da linhagem de glioma humano T98G, após o tratamento com AINEs (inibidor de COXs). A superexpressão de 15-PGDH em T98G levou a uma redução do crescimento celular, enquanto que a inibição da mesma resultou no aumento do crescimento celular.

Da mesma forma que os estudos com GBM, a expressão diminuída de 15-PGDH tem sido observada em vários canceres, incluindo câncer gástrico (Thiel et al., 2009), pulmão (Ding et al., 2005), cólon (Yan et al., 2004), mama (Wolf et al., 2006) e pâncreas (Pham et al., 2010). A expressão diminuída de 15-HPGD em muitos casos está associada com a redução da tumorigênese. Enquanto que a perda de função leva ao acúmulo de PGE₂ que sustenta a carcinogênese e progressão do tumor. Assim, a diminuição na expressão de 15-PGDH em tecidos tumorais pode ser um dos principais mecanismos para o aumento de PGE₂ em câncer.

Estes resultados em conjunto apoiam a hipótese de que a degradação de PGE₂ como um resultado da expressão aumentada de 15-PGDH, pode suprimir as metástases, proliferação e invasão além de funcionar como um supressor do tumor de células cancerosas (Tai, 2011).

Semelhante a 15-PGDH, estudos com PGT têm demonstrado também uma baixa expressão desse transportador em vários canceres, sugerindo que alterações no metabolismo de PGE₂ tem um papel importante no desenvolvimento do câncer.

A visão atual sobre o papel biológico de PGT é de mediar a captação de prostaglandinas secretadas, permitindo a sua inativação pela 15-PGDH. Por isso, a relevância de PGT, nos poucos estudos em câncer tem sido exclusivamente ligada ao catabolismo das prostaglandinas.

PGT medeia o transporte das PGs, através da troca de um anión lactato com a PGs, que é negativamente carregado a um pH fisiológico (Chan et al., 2002). Uma vez que a maioria das células tumorais tem alta concentração de lactato intracelular como um subproduto da glicólise, o efluxo de lactato facilita o influxo de PGE₂ a partir do espaço pericelular. A importação de PGE₂ a partir do espaço pericelular diminui a ligação e ativação dos receptores EP sobre a superfície celular. No entanto, a função de transporte em outras células no microambiente tumoral também pode ser importante no controle dos níveis extracelulares de PGE₂ (Greenhough et al., 2009; Holla et al., 2008; Subbaramiah et al., 2011).

Os níveis de mRNA e de proteína de PGT foram determinadas por PCR em tempo real, Western blot e imunohistoquímica em tecidos de câncer colorretal e de tecido normal adjacente. Foi observado nos experimentos realizados, uma maior expressão do mRNA e da proteína PGT nas amostras de tecidos normais em relação as amostras de pacientes com câncer colorretal (Shang et al., 2015).

De uma forma similar os nossos resultados demonstraram que a expressão de PGT e 15-PGDH apresentaram níveis baixos nas linhagens U-251MG e U-87MG.

Na imunofluorescência observamos uma marcação forte para 15-HPGD na linhagem U-251MG e U-87MG e para PGT, observamos uma marcação forte para U87MG e nenhuma marcação para U-251MG. Esses resultados sugerem que os níveis reduzidos de PGT e 15-PGDH, podem contribuir para níveis elevados de PGE₂ no microambiente tumoral contribuindo assim para o desenvolvimento do GBM.

No entanto, os mecanismos exatos para a baixa expressão de PGT e 15-HPGD na carcinogênese não são conhecidos. Como foi relatada, a expressão baixa ou a inibição de PGT, além de 15-PGDH, constituiria um meio muito eficaz de aumentar os níveis locais de PGE₂, podendo em GBM serem considerados como um alvo para manipulação terapêutica.

5.2 LC/ESI-MS/MS nas linhagens de GBM

Considerando que o aumento da produção de alguns prostanoïdes derivados de DHGLA (série 1), AA (série 2) e EPA (série 3) estão envolvidos em processos fisiopatológicos relacionados com o desenvolvimento e a disseminação de vários tumores (Klapan et al., 1992; Pan et al., 2015; Reader et al., 2011; Sasaki et al., 2015),

avaliamos o perfil de produção de alguns desses prostanoïdes e seus metabólitos em cinco linhagens de GBM diferentes (T98G, U-138MG, A172, U-251MG e U-87MG).

Os resultados obtidos neste trabalho, demostraram que nas análises feitas com os prostanoïdes da série 2 todas as linhagens apresentaram um perfil muito semelhante em relação a produção do TXB₂, PGD₂, 15dPGJ₂, PGJ₂ e delta 12-PGJ₂. Por outro lado os prostanoïdes PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂, 13,14dhPGF_{2α}, 15kPGE₂, 13,14dh15kPGF_{2α}, 13,14dh15kPGE₂ apresentaram um perfil bem variado entre as linhagens.

Analizando separadamente cada um desses prostanoïdes, podemos dizer que nas cinco linhagens de GBM, foi constatada uma maior produção do prostanoïde TXB₂ (produto da hidrólise de TXA₂) em relação aos outros prostanoïde analisados.

Os dados obtidos neste trabalho, foram muito semelhantes com os obtidos por Castelli et al., (1989) que observou em 33 amostras de gliomas e 6 amostras de metástases cerebrais (3 de pulmão, 1 de mama, 1 de melanoma e 1 gástrico), uma maior prevalência do TXB₂ em relação a PGE₂, PGD₂ e PGF_{2α}. Em comparação com o tecido cerebral normal, a produção de TXB₂ também foi superior,

Em outro trabalho, foi encontrada em um grande painel de linhagens celulares de glioma uma alta produção de TXB₂, além da expressão elevada da TXAS e do receptor TP em comparação com os astrócitos normais. Estes dados foram relacionados com as altas taxas de migração destas células. A produção aumentada de TXB₂ em linhagens de glioma está correlacionada com as taxas de migração destas células (Giese et al., 1999).

No estudo realizado com as linhagens obtidas de amostras de pacientes com GBM, G112p (maior capacidade de migração) e G112ms (menor capacidade de migração), observou-se uma maior expressão da TXAS na linhagem G112p em relação a linhagem G112ms. Porém a alta capacidade de migração das células G112p foram comprometidas após os tratamentos com dazmegrel e furegrelate (antagonistas da TXAS) (McDonough et al., 1998).

O uso de furegrelate em outros trabalhos, além de estar relacionado com a inibição do processo de migração, também esteve relacionado com a diminuição da adesão, aumentou da apoptose, crescimento do tumor *in vivo* e aumento da sensibilidade à radiação em células derivadas de glioma (Giese et al., 1999; Kürzel et al., 2002; Schauff et al., 2009; Yoshizato et al., 2002).

Apesar de não conhecer detalhadamente os mecanismos de ação do tromboxano nas células tumorais, este prostanoïde demonstra ter um papel importante na tumorigênese de gliomas. Por isso o uso de inibidores para biossíntese do tromboxano

podem ser um dos caminhos para aumentar a susceptibilidade das células de glioma para quimioterapia e radioterapia convencional.

Outras semelhanças encontradas entre as cinco linhagens foram em relação à produção de PGD₂ e dos seus metabólitos. PGD₂ é um importante metabólito da COX-2 que possui atividades contraditórias (pró-inflamatória ou anti-inflamatória) em condições patofisiológicas.

No entanto, a implicação da produção de PGD₂ em tumores é praticamente inexplorada. Os poucos estudos envolvendo este prostanoide, consideram que PGD₂, assim como PGI₂, apresentam atividade antitumoral (Murata et al., 2008).

Esta hipótese é sustentada pelos trabalhos que demostram que níveis elevados de PGD₂ causaram menos focos metastáticos no pulmão de ratos, inibição do crescimento de células leucêmicas e de tumores de Ehrlich, além de diminuir o potencial metastático em melanomas (Fukushima et al., 1982; Narumiya et al., 1987; Stringfellow, Fitzpatrick, 1979).

No trabalho de Park et al., (2007) que avaliou a possível influência de PGD₂ no desenvolvimento de adenomas intestinais, foi mostrado no modelo de rato Apc^{Min/+} nocaute para a enzima H-PGDS, um aumento de 50% dos adenomas intestinais, enquanto que no modelo de ratos Apc^{Min/+} com alta expressão de H-PGDS ocorreu uma redução de aproximadamente 80% dos adenomas.

Em gliomas, a diminuição dos níveis de proteína e mRNA da sintase L-PGDS (principal sintase produzida nos neurônios e nas células gliais) foram observados em diferentes amostras de GBM quando comparada ao tecido cerebral normal (Payne et al., 2008). Além disto, a adição exógena de PGD₂ nas linhagens A172 e C6 resultou na diminuição da capacidade proliferativa das células (Conde et al., 1991; Payne et al., 2008).

Em trabalhos anteriores do nosso laboratório, foi visto que a adição de PGD₂ em condições fisiológicas nas linhagens A172, U-87MG e U-251MG, aumentou a proliferação das linhagens celulares em comparação aos seus controles (Ferreira, 2014). Além disso, vimos também que a adição exógena de PGD₂ nas linhagens U-251MG e U-87MG aumentou significativamente a migração das células.

Assim como outros prostanoïdes, PGD₂ *in vivo* tem uma vida muito curta, sendo convertido rapidamente a diferentes metabólitos. Nos dados encontrados neste trabalho, observamos nas cinco linhagens uma baixa produção do metabólito 15dPGJ₂ e a ausência dos metabólitos PGJ₂ e delta 12-PGJ₂.

A adição exógena de 15d-PGJ₂ na linhagem JC (adenocarcinoma mamário de rato), foi responsável pela diminuição da migração estimulando a desmontagem da adesão focal e reorganização da actina (Diers et al., 2010).

No trabalho realizado por Trindade-da-Silva et al., (2016) o metabólito 15d-PGJ₂ em células TPC-1(câncer de tireoide) diminuiu as atividades proliferativas das células, além de aumentar a apoptose. Em outra linhagem conhecida como MCG-803 (câncer gástrico), 15d-PGJ₂ inibiu o crescimento celular e induziu a apoptose através da diminuição da relação entre COX-2 e Bcl-2/Bax (Chen et al., 2003). Além disso, 15-dPGJ₂ induziu a apoptose independente de caspase em células de glioma humano A172 por meio de formação de ROS e dano mitocondrial (Cho et al., 2006).

A 15-dPGJ₂ é um produto da desidratação de PGD₂, que possui alta afinidade a PPAR γ , conhecido por ser um mediador potencial de apoptose. Acredita-se que 15dPGJ₂ possa influenciar na tumorigênese de vários tumores através de PPAR γ (Houseknecht et al., 2002; Surh et al., 2011).

No caso de PGJ₂ e delta 12-PGJ₂, os trabalhos demonstram que estes metabólitos são conhecidos por reduzir a proliferação celular e aumentarem a apoptose nos tumores de melanoma (Paulitschke et al., 2012), câncer do ovário (de Jong et al., 2011), câncer de colo-rectal e leucemia (Shin et al., 2009).

Sendo assim, não encontrarmos a produção desses metabólitos nas linhagens de GBM, não foi nenhuma surpresa. Uma vez, que esses metabólitos possuem um papel anti tumoral em diferentes tipos tumorais, incluindo GBM (Clay et al., 2002; Piva et al., 2005; Zander et al., 2002). Porém são necessários mais estudos para tentar entender o papel duplo que PGD₂ exerce em GBM.

Em relação às diferenças encontradas nos perfis entre as cinco linhagens, tivemos uma produção variada do prostanoide PGF_{2 α} e seus principais metabólitos (13,14dhPGF_{2 α} e 13,14dh15kPGF_{2 α}), além da produção variada de PGE₂ e seus metabólitos 13,14dh15kPGE₂ e 15kPGE₂.

No caso de PGF_{2 α} a única linhagem que não encontramos a produção desse prostanoide foi na U-251MG, porém na linhagem foi encontrada grande produção do metabólito 13,14dhPGF_{2 α} . Isso indica que este prostanoide foi produzido pela célula.

Na literatura PGF_{2 α} está relacionada à promoção da angiogênese e o crescimento tumoral em carcinoma endometrial (Sales et al., 2008). Em melanoma as quantidades de PGF_{2 α} foram maiores do que as encontradas em melanócitos normais, porém a

quantidade do receptor de FP no tumor foi bem reduzida (Scott et al., 2005). Fricke et al., (2010) sugeriram que PGF_{2α} pode facilitar a progressão do melanoma através de células como fibroblastos e as células endoteliais, as quais expressam o receptor de FP.

Em relação a PGE₂, estudos realizados na década de 80, demonstraram que as células tumorais de glioma, especialmente de GBM, produzem uma grande quantidade de PGE₂ tanto no modelo *in vitro* quanto no modelo *in vivo* (Cooper et al., 1984; Castelli et al., 1989). Loh et al., (2002) elucidou por análise de HPLC altos níveis de PGE₂ em GBM quando comparados com outros astrocitomas de baixo graus e metástases cerebrais. Em relação aos controles a produção de PGE₂ nas amostras tumorais de GBMs foi seis vezes maior. No trabalho, realizado por Käkoğlu et al., (1998) o nível de PGE₂ quantificado pela técnica de Elisa foi significativamente maior em gliomas e meningiomas quando comparado ao tecido controle.

Sendo assim, com os dados obtidos por LC-MS/MS apresentados por este trabalho, podemos dizer que a produção dos prostanoïdes da série 2 e seu metabólitos, principalmente do TXB₂ e PGE₂, reforçam a ideia de que os prostanoïdes da série 2 possuem um papel importante em GBM e possivelmente estão relacionados com maior proliferação e agressividade, conforme sugere a literatura em outros tipos de câncer. Além disso, esse trabalho também demonstrou que novos estudos necessitam ser realizados para tentar elucidar o papel de PGD₂ e PGF_{2α} em GBM.

Outro dado importante que chamou a atenção neste trabalho foi a ausência dos prostanoïdes da série 1 e da série 3 nas linhagens analisadas.

Os trabalhos encontrados na literatura, mostraram que prostanoïdes da série 1 e 3 possuem uma atividade antitumoral, podendo potencialmente antagonizar com os efeitos pró tumorais dos prostanoïdes da série 2. Porém os mecanismos subjacentes responsáveis por estas atividades não são totalmente elucidados (Cockbain et al., 2012; D'Eliseo et al., 2012; Serini et al., 2009).

Estudos realizados por Yang et al., (2014) mostraram que a adição exógena de PGE₃ inibiu a proliferação das células de câncer de pulmão, enquanto que a adição exógena de PGE₂ estimulou o crescimento destas células.

A suplementação de células tumorais com DGLA (responsável pela formação dos prostanoïdes da série 1) ou EPA (responsável pela formação dos prostanoïdes da série 3), diminuiu o crescimento de vários tipos de tumores, incluindo os do pulmão, do cólon, das mamas e da próstata (Dommels et al., 2003; Wang et al., 2012; Xu, Qian, 2014).

No estudo realizado pelo nosso laboratório, mostrou que o tratamento com GLA em células C6 inibiu 30% da migração celular (Ramos e Colquhoun, 2003). Em outro estudo a exposição de células W256 a GLA e EPA, afetou o processo de apoptose através da liberação de citocromo c pela mitocôndria, produção aumentada de espécies reativas de oxigênios e um aumento da peroxidação lipídica (Colqhoun e Schumacher, 2001).

No trabalho realizado por Das, Madhavi (2011), a suplementação com EPA e DGLA em células de carcinoma cervical humano potencializou a ação citotóxica de vincristina. EPA e DGLA melhoraram a absorção de vincristina e inibiram o seu efluxo, aumentando assim a concentração intracelular da droga.

Uma das possíveis causas para não termos encontrado os prostanoïdes da série 1 e serie 3 nas linhagens de GBM, é provavelmente pela pouca oferta de substrato *in vitro* para formação desses prostanoïdes.

Naturalmente no cérebro encontramos uma composição de ácido graxos único, com níveis elevados de AA e baixos de EPA (Brenna, Diau, 2007; Crawford et al., 1976). Além do mais, os ácidos graxos EPA e DHGLA possuem mais algumas desvantagens em relação ao AA em células tumorais.

O DGLA em condições normais é naturalmente dessaturado para a produção do AA. No entanto, devido à atividade limitada de $\Delta 5$ dessaturase em seres humanos, apenas uma parte de DGLA é convertida em AA. Em células tumorais esse equilíbrio é perdido e acabamos tendo uma maior formação do AA (Wang, Lin, 2012). Mesmo em casos de suplementação de células com DGLA a quantidade encontrada de AA ainda é 3 vezes maior que o DGLA, principalmente devido à eficaz dessaturação de DGLA a AA (Fujimoto et al., 2010).

No caso de EPA, foi visto que proteínas como cPLA2, COXs e sintases que estão envolvidas na biossíntese dos prostanoïdes da série 3, tem maior preferência por AA do que ao EPA (Leslie, 2004).

Apesar de tudo o que foi mostrado na literatura, vimos em trabalhos anteriores do laboratório e neste mesmo trabalho (discutiremos a seguir) que apesar dos prostanoïdes da série 1 e 3 não terem sidos produzidos pelas células U-251MG e U-87MG, a adição exógena de alguns desses prostanoïdes foram capaz de aumentar o processo de migração dessas células. Em outro trabalho realizado com a linhagem T98G, a adição exógena de PGE₁ assim como de PGE₂ foi responsável por afetarem

positivamente diversos processos celulares importantes, para a progressão tumoral, como migração, proliferação e apoptose. (Gomes, Colquhoun, 2012).

Apesar de não termos detectado a produção dos prostanoïdes das séries 1 e 3 nas linhagens, isso não significa que em outras situação esses prostanoïdes não possam ter um função no desenvolvimento do tumor.

5.3 Migração celular nas linhagens U-251MG e U-87MG tratadas com prostanoïdes

O GBM é caracterizado por seu comportamento agressivo e por sua elevada taxa de recorrência, principalmente pela sua grande capacidade de migração e de invasão ao tecido cerebral sadio.

Em estudos anteriores realizados com a linhagem T98G, foi visto que após os tratamentos com PGE₂ e PGE₁ exógeno, tivemos um aumento significativo no processo de migração celular. Em contrapartida, o tratamento com Ibuprofeno (inibidor não seletivo de COX), diminuiu o processo de migração celular em T98G (Gomes, Colquhoun, 2012). Em outros estudos realizados com câncer de pâncreas e de colo-retal, a adição exógena de PGE₂ também estimulou a migração desses tumores (Buchanan et al., 2003; Charo et al., 2013).

No trabalho de Feitoza (2013), a adição de PGE₂ nas linhagens U-251MG e U-87MG aumentou a expressão de proteínas importantes da MEC envolvidas na migração e invasão tumoral. Em conjunto, esses dados demostram a influência que PGE₂ tem no processo de migração tumoral.

Embora a maior parte dos estudos envolvendo migração seja em torno de PGE₂, é importante verificar a possível influência de outros prostanoïdes na migração de GBM. Uma vez que, estudos têm demonstrado que outros prostanoïdes, além de PGE₂, também podem influenciar no desenvolvimento do tumor (Schneider, Pozzi, 2011).

No trabalho realizado por Sales et al., (2008) utilizando a linhagem FPS (células de adenocarcinoma do endométrio que expressam de forma estável o receptor FP) foi visto que PGF_{2α} através de seu receptor FP aumentou a capacidade migratória das células FPS. Assim como os estudos mostrados acima, nossos resultados mostram que todos os prostanoïdes da série 2 (PGE₂, PGD₂ e PGF_{2α}) analisados, aumentaram a capacidade de migração da linhagem U-251MG, enquanto que na linhagem U-87MG os prostanoïde E₂ e D₂ também aumentaram a migração das células.

Em relação aos prostanoïdes da série 1, este trabalho mostrou que tanto PGE₁ como PGD₁, também aumentaram significantemente a migração celular nas linhagens U-251MG e U87-MG. Apesar de não terem sido detectados por LC-MS/MS os prostanoïdes da série 1, assim como os prostanoïdes da série 2, aumentaram o processo de migração celular nas linhagens U-251MG e U87-MG.

No trabalho de Gomes, Colquhoun (2012) a adição de PGE₁ exógena nas linhagens de GBM T98G aumentou significativamente o processo de migração, enquanto que a adição do Ibuprofeno reverteu o aumento da migração.

Uma das explicações para a influência de PGE₁ e PGD₁ exógeno na migração das células de GBM, seria a utilização dos mesmos mecanismos e receptores usados pelos prostanoïdes da série 2. Uma vez que em ambos os casos (série 1 e série 2) a metabolização ocorre de um modo semelhante com a participação de as mesmas enzimas, além de compartilharem o mesmo sistema receptor EP (Das, 2006). Portanto bastaria a produção de apenas uma das séries dos prostanoïdes para termos toda a maquinaria de ação a disposição de outras séries.

Como vimos anteriormente por LC-MS/MS, as linhagens U-251MG e U87-MG já estão produzindo prostanoïdes da série 2, portanto possuem toda a maquinaria que pode ter facilitado a ação de PGE₁ e PGD₁ adicionados as células de forma exógeno. Outro fato que também deve ter contribuído para a influência dos prostanoïdes da série 1 e 2, foi a baixa expressão das proteínas PGT e 15-HPGD observadas por qRT-PCR. A baixa expressão desses genes colabora com uma degradação ineficiente dos prostanoïdes, facilitando assim uma maior oferta desses prostanoïdes para as células.

Esses dados são importantes, pois além de reforçar a importância dos prostanoïdes da série 2, também demonstram pela primeira vez a influência de PGE₁ e principalmente de PGD₁ no processo de migração de GBM. Contrariando assim os dados da literatura que até o momento só atribuíram os prostanoïdes da série 1 o papel de anti-tumorigênico. Este trabalho mostrou que estes prostanoïdes também podem ter um efeito pró-tumorigênico em relação à migração de GBM.

Porém os mecanismos pelo quais os prostanoïdes agem não são conhecidos e novos estudos devem ser realizados para elucidar esses mecanismos.

Assim como os estudos mostrados acima, a adição exógena dos prostanoïdes da série 1 (PGE₁ e PGD₁) e da série 2 (PGE₂, PGD₂ e PGF_{2α}) aumentaram a migração celular nas linhagens U-251MG e U87-MG. Sendo PGE₂ e PGE₁ os prostanoïdes que mais se destacaram em ambas as linhagens.

5.4 Influências dos receptores EP2 e EP4 na migração celular das linhagens U-251MG e U-87MG

Segundo a literatura, para PGE₂ exercer sua influência no processo de migração é necessário à ativação de um dos seus quatro receptores. No trabalho de Cheng et al., (2014) PGE₂ promoveu o aumento da migração das células Huh-7 (hepatocarcinoma) através do seu receptor EP2. Na linhagem PC3 (câncer de próstata) os resultados indicaram que a migração induzida por PGE₂ foi mediada, em parte, por EP4 (Huang et al., 2013). Já nas linhagens CCLP1 e HuCCT1 (câncer de fígado) o aumento da migração causado pela adição de PGE₂ ocorreu através do receptor EP3 (Du et al., 2015).

Como vimos anteriormente, as linhagens U-251MG e U87-MG utilizadas neste estudo expressam apenas os receptores EP2 e EP4. Desse modo utilizamos os antagonistas específicos AH6809 e L161.982 para o bloqueio das funções de EP2 e EP4 respectivamente. Assim poderíamos determinar se os receptores estavam de fato envolvidos no processo de migração junto com PGE₂.

Num primeiro momento, demostramos que a inibição dos receptores EP2 e EP4 pelos seus respectivos antagonistas (AH6809 e L161.982) diminuíram a migração das células U-251MG e U-87MG de uma forma muito similar entre eles. Esses dados mostraram que os dois receptores de forma muitas parecidas estão envolvidos na migração das células de GBM.

Nossos dados são muito similares com os estudos que associam os receptores EP2 e EP4 com o processo de migração das células tumorais. Nos trabalhos de Vaid et al., (2015) e Xu et al., (2014) o uso do antagonista AH6809 (EP2) nas linhagens de melanoma e (A375 e Hs294t) e do antagonista ONO-AE3-208 (EP4) nas linhagens de próstata (PC-3 em LNCaP) diminuíram significativamente a capacidade de migração dessas células.

Em outro trabalho, foi visto que o aumento na migração em células tumorais de mama (410.4, 410, e 66.1) causado em resposta a adição exógena de PGE₂, foi bloqueado pelo uso dos antagonistas AH6809 (EP2) ou AH23848 (EP4). No mesmo trabalho foi demonstrado que esses mesmos receptores também foram importantes para o crescimento dessas células (Ma et al., 2006).

Em conjunto com os trabalhos apresentados na literatura, os nossos dados sugerem que a inibição de EP2 e EP4 por seus antagonistas específicos podem contribuir para a diminuição da migração celular de GBM.

Uma das possíveis vias pelo qual esses receptores devem estar influenciando na migração das células U-251MG e U-87MG é através da ativação da via de sinalização do cAMP. Uma vez que ambos os receptores EP2 e EP4 estão acoplados à proteína Gs promovendo o aumento na concentração intracelular de cAMP (Sugimoto, Narumiya, 2007).

No trabalho realizado por Timoshenko et al., (2003) demonstrou que o aumento da migração causado pela adição exógena de PGE₂ nas linhagens C3L5, MCF-7 e MDA-MB-231, foi através do receptor EP4 com o aumento de cAMP. Em adenocarcinoma a estimulação do receptor de EP induziu a ativação da via adenilato-ciclase / cAMP / PKA (Buchanan et al., 2003). Na linhagem U-87MG a adição exógena de PGE₂ aumentou a fosforilação de cAMP (Bidwell et al., 2010).

Num segundo momento fizemos uso dos inibidores de EP2 e/ou EP4 junto com a adição exógena de PGE₂, assim poderíamos confirmar a hipótese de que os receptores EP2 e EP4, junto com PGE₂ estavam envolvidos no processo de migração de GBM.

Os resultados mostraram que a adição exógena de PGE₂ nas células de GBM que tiveram um de seus receptores inibidos (EP2 ou EP4), foi capaz de aumentar à capacidade de migração dessas células em comparação as células que também tiveram um dos seus receptores inibidos, mas sem a adição exógena de PGE₂. Porém o aumento da migração dessas células foi inferior às tratadas apenas com PGE₂ sem a inibição dos receptores.

Esses dados mostram que para que PGE₂ possa influenciar de forma efetiva no processo de migração celular é necessária que as nas linhagens U-251MG e U-87MG tenham disponível pelo menos um de seus receptores EPs (EP2 ou EP4).

Ao inibirmos simultaneamente os dois receptores esperávamos a princípio, uma redução quase que total da migração em ambas as linhagens. Porém os dados mostraram apenas uma redução significativa da migração em ambas às linhagens, resultados esses que foram muito parecidos com os obtidos nas células que tiveram um dos receptores inibida e não a adição de PGE₂.

Esses dados demonstram que com a inibição dos receptores EP2 e EP4 nas linhagens U-87MG e U-251MG, PGE₂ deve estar interagindo com outros receptores para influenciar no processo de migração.

Como sabemos, na literatura é descrito que apesar da especificidade da maioria dos receptores derivados da via da COX, o receptor TP (do TXA₂) também pode ser

estimulado pelos prostanoïdes PGE₂, PGI₂ e PGF_{2α} (Bos et al., 2004; Coleman et al., 1994).

Como vimos nos dados de LC-MS/MS ambas as linhagens produzem TXB₂, além de dados preliminares de imunocitoquímica mostrarem a expressão da TXS. Outro dado importante visto na literatura é a presença do receptor TP em GBM.

Isso mostra que possivelmente PGE₂ deve estar interagindo com o receptor TP (do TXA₂), porém a interação com esses outros receptores não é tão eficiente quanto à dos receptores EP2 e EP4.

Outra explicação para os dados obtidos com a inibição de ambos os receptores é que a migração de U-251MG e U-87MG não são influenciadas apenas por PGE₂. Isso explicaria também o aumento da migração celular através de outros prostanoïdes como foi demonstrado nos experimentos anteriores com a adição exógena de PGE₂, PGE₁, PGD₂, PGD₁ e PGF_{2α}.

Coletivamente com os estudos apresentados aqui, o presente trabalho demonstrou de forma inédita de que PGE₂ tem um papel importante no processo de migração das células de GBM (figura 22). Papel este que é mediado, pelo menos em parte, por uma alteração na resposta celular através da ativação dos receptores EP2 e EP4, mas os mecanismos pelos quais isto ocorre não são conhecidos. Por isso, existe a necessidade em estudar os mecanismos pelos quais a PGE₂ interfere na migração das células, para determinar num futuro novos alvos e novas estratégias terapêuticas adjuvantes no tratamento de GBM.

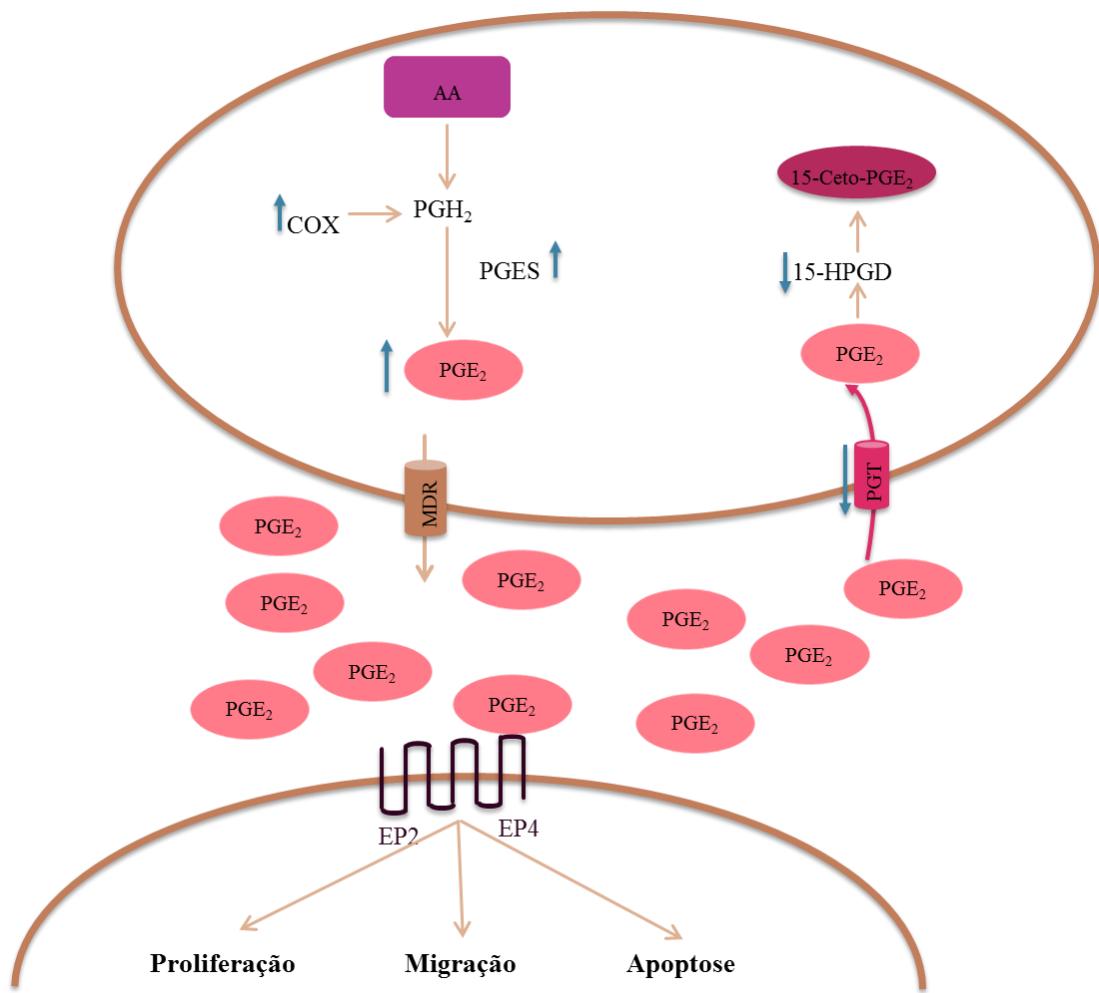


Figura 22 - Representação da possível ação de PGE₂ em GBM.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão nossos resultados mostraram que de uma forma geral os prostanoïdes possuem um papel importante no processo de migração das células U-251MG e U-87MG.

Entre esses prostanoïdes destacamos PGE₂, que em partes influenciou a migração das células GBM através da ativação dos receptores EP2 e EP4.

As principais conclusões desse estudo foram:

- A. Observamos por qRT-PCR a expressão das proteínas envolvidas na biossíntese de PGE₂ (COX-1, COX-2, cPGES, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD) nas linhagens de GBM U-251MG e U-87MG.
- B. Observamos por imunofluorescência a expressão proteica de COX-1, COX-2, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4 e 15-HPGD na linhagem U-251MG e COX-1, COX-2, cPGES, mPGES1, mPGES2, EP2, EP4, PGT e 15-HPGD na linhagem U-87MG.
- C. Demostramos um perfil de produção diferente entre as linhagens U-251MG, U-87MG, T98G, A-172 e U-138MG em relação aos produtos da via das ciclooxygenases: 6kPGF_{1 α} , TXB₃, TXB₂, PGE₃, PGF_{1 α} , PGF_{2 α} , PGD₃, PGE₂, PGE₁, 13,14dhPGF_{2 α} , PGD₁, PGD₂, 15kPGE₂, 13,14dh15kPGF_{2 α} , 13,14dh15kPGF_{1 α} , 13,14dh15kPGE₂, 13,14dh15kPGE₁, PGJ₂, delta12PGJ₂, 15dPGJ₂.
- D. Nas linhagens U-251MG e U-87MG demostramos um aumento no processo de migração após o tratamento com PGE₁, PGE₂, PGD₁, PGD₂ e PGF_{2 α} exógeno.
- E. Observamos que os tratamentos realizados nas linhagens U-251MG e U-87MG com os antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) ou EP4 (L-161982) inibiram a migração celular.
- F. Observamos que o tratamento realizado com PGE₂ exógeno e os antagonistas dos receptores EP2 (AH6809) e EP4 (L-161982) em conjunto, não foram suficientes para inibir completamente a migração das linhagens U-251MG e U-87MG.

REFERÊNCIAS*

Adamson DC, Rasheed BA, McLendon RE, Bigner DD. Central nervous system. Cancer Biomark. 2010; 9(1-6):193-210.

Aithal MG, Rajeswari N. Validation of housekeeping genes for gene expression analysis in glioblastoma using quantitative real-time polymerase chain reaction. Brain Tumor Res Treat. 2015 Apr;3(1):24-9.

Alifieris C, Trafalis DT . Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. Pharmacol Ther. 2015 Aug;152:63-82.

Allaj V, Guo C, Nie D. Non-steroid anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and cancer. Cell Biosci. 2013 Feb 6;3(1):8.

Amano H, Hayashi I, Emoto H, et al. Host prostaglandin E2-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. J Exp Med 2003;197:221 – 32.

Amano H, Ito Y, Suzuki T, Kato S, Matsui Y, Ogawa F, Murata T, Sugimoto Y, Senior R, Kitasato H, Hayashi I, Satoh Y, Narumiya S, Majima M. Roles of a prostaglandin E-type receptor, EP₃, in upregulation of matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis. Cancer Sci. 2009 Dec;100(12):2318-24..¹

Anagnostopoulos-Schleep J, Fahrendorf G, Krähling KH, König HJ, Herter T. Tumors of the crani spinal transition: a rare and often misdiagnosed disease. Med Klin (Munich). 1989 Sep 15;84(9):450-8.

Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. Biochem J. 1994 Sep 15;302 (Pt 3):723-7.

Arima M, Fukuda T. Prostaglandin D₂ and T(H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. Korean J Intern Med. 2011 Mar;26(1):8-18.

Bacac, M. and I. Stamenkovic, Metastatic cancer cell. Annu Rev Pathol, 2008. 3: p. 221-47.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet].Uniform requirements for manuscripts submitted to Beomedical Journal: samplr references. [Updated 2011 jul15]. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Backlund MG, Mann JR, Holla VR, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J Biol Chem* 2005; 280:3217–23

Bao Y, Pucci ML, Chan BS, Lu R, Ito S, Schuster VL. Prostaglandin transporter PGT is expressed in cell types that synthesize and release prostanoids. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F1103–10.

Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jun;36(6):1046-69.

Bergström S, Duner H, von Euler R, Pernow B, Sjövall J. Observations on the effects of infusion of prostaglandin E in man. *Acta Physiol Scand*. 1959 Mar 31;45:145-51.

Bidwell P, Joh K, Leaver HA, Rizzo MT. Prostaglandin E₂ activates cAMP response element-binding protein in glioma cells via a signaling pathway involving PKA-dependent inhibition of ERK. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2010 Feb;91(1-2):18-29.

Bing Liu, Liyan Qu, and Shigui Yan Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int*. 2015; 15: 106.

Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol* 2012; 108:11-27.

Bos CL' Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jul;36(7):1187-205.

Brenna JT, Diau GY. The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007 Nov-Dec; 77(5-6):247-50.

Brocard E, Oizel K, Lalier L, Pecqueur C, Paris F, Vallette FM, Oliver L. Radiation-induced PGE2 sustains human glioma cells growth and survival through EGF signaling. *Oncotarget*. 2015 Mar 30;6(9):6840-9.

Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM, DuBois RN. Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 31;103(5):1492-7.

Buchanan FG, Wang D, Bargiacchi F, DuBois RN. Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 2003 Sep 12;278(37):35451-7.

Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis.* 1998 May;19(5):723-9.

Camacho M, León X, Fernández-Figueras MT, Quer M, Vila L. Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2008 Sep;30(9):1175-81

Cao Y, Prescott SM. Many Actions of Cyclooxygenase-2 in Cellular Dynamics and in Cancer. *Journal of Cellular Physiology.* 2002;190:279-86.

Castelli MG, Chiabrando C, Fanelli R, Martelli L, Butti G, Gaetani P, Paoletti P. Prostaglandin and thromboxane synthesis by human intracranial tumors. *Cancer Res.* 49:1505–1508, 1989 21.

Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science.* 2005 Dec 2;310(5753):1504-10.

Chan BS, Endo S, Kanai N, Schuster VL. Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Jun;282(6):F1097-102.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 15;99(21):13926-31.

Chang JE, Khuntia D, Robins HI, Mehta MP. Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2007;5:894–902.

Chang SH, Liu CH, Conway R, Han DK, Nithipatikom K, Trifan OC, Lane TF, Hla T.. Role of prostaglandin E₂-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 13;101(2):591-6

Charo C, Holla V, Arumugam T, Hwang R, Yang P, Dubois RN, Menter DG, Logsdon CD, Ramachandran V. Prostaglandin E2 regulates pancreatic stellate cell activity via the EP4 receptor. *Pancreas*. 2013 Apr;42(3):467-74.

Chen C, Bazan NG. Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2005 Sep;77(1-4):65-76.

Cheng SY, Zhang H, Zhang M, Xia SK, Bai XM, Zhang L, Ma J, Rong R, Wang YP, Du MZ, Wang J, Chen M, Shi F, Yang QY, Leng J. Prostaglandin E₂ receptor EP2 mediates Snail expression in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2014 May;31(5):2099-106.

Chen YX, Zhong XY, Qin YF, Bing W, He LZ. 15d-PGJ2 inhibits cell growth and induces apoptosis of MCG-803 human gastric cancer cell line. *World J Gastroenterol*. 2003 Oct;9(10):2149-53.

Cheuk IW, Shin VY, Siu MT, Tsang JY, Ho JC, Chen J, Tse GM, Wang X, Kwong A. Association of EP2 receptor and SLC19A3 in regulating breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res*. 2015 Oct 15;5(11):3389-99.

Chiu WT, Shen SC, Chow JM, Lin CW, Shia LT, Chen YC. Contribution of reactive oxygen species to migration/invasion of human glioblastoma cells U87 via ERK-dependent COX-2/PGE(2) activation. *Neurobiol Dis*. 2010 Jan;37(1):118-29.

Cho WH, Choi CH, Park JY, Kang SK, Kim YK. 15-deoxy-(Delta12,14)-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) induces cell death through caspase-independent mechanism in A172 human glioma cells. *Neurochem Res*. 2006 Oct;31(10):1247-54.

Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O, Langenbach R. Genetic disruption of PTGS-1, as well as PTGS-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res*. 2000 Sep 1;60(17):4705-8.

Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol*. 2007 Nov; 114(5):443-58.

Clay CE, Monjazeb A, Thorburn J, Chilton FH, High KP. 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis does not require PPARgamma in breast cancer cells. *J Lipid Res*. 2002 Nov;43(11):1818-28.

Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut*. 2012;61:135–49.

Colquhoun A, Schumacher RI. gamma-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Oct 31;1533(3):207-19.

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*. 1994 Jun;46(2):205-29.

Conde B, Tejedor M, Sinues E, Alcala A. Modulation of cell growth and differentiation induced by prostaglandin D2 in the glioma cell line C6. *Anticancer Res*. 1991 Jan-Feb;11(1):289-95.

Cooper C, Jones HG, Weller RO, Walker V: Production of prostaglandins and thromboxane by isolated cells from intracranial tumors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 47: 579–584, 1984.

Crawford MA, Casperd NM, Sinclair AJ. The long chain metabolites of linoleic and linolenic acids in liver and brain in herbivores and carnivores. *Comp Biochem Physiol B*. 1976; 54(3):395-401.

Crocetti E, Trama A, Stiller C, Caldarella A, Soffietti R, Jaal J, Weber DC, Ricardi U, Slowinski J, Brandes A. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer*. 2012;48(10):1532-42.

Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Jul;15(7):455-65.

Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN, Dey SK. Cyclooxygenase is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Res*. 2005 May 1;65(9):3735-44.

Das UN: Essentials Fatty Acids – a review. *Curr Pharm Biotechnol* 2006, 7, 467–482

Das UN, Madhavi N. Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells in vitro. *Lipids Health Dis*. 2011 Sep 14;10:159.

Davis JN, McCabe MT, Hayward SW, Park JM, Day ML. Disruption of Rb/E2F pathway results in increased cyclooxygenase-2 expression and activity in prostate epithelial cells. *Cancer Res*. 2005 May 1;65(9):3633-42. *Med Oncol*. 2009;26(2):170-7.

de Groot DJ, de Vries EG, Groen HJ, de Jong S. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. Crit Rev Oncol Hematol. 2007 Jan;61(1):52-69.

de Jong E, Winkel P, Poelstra K, Prakash J. Anticancer effects of 15d-prostaglandin J2 in wild-type and doxorubicin resistant ovarian cancer cells: novel actions on SIRT1 and HDAC. PLoS One. 2011;6(9):e25192.

D'Eliseo D, Manzi L, Merendino N, Velotti F. Docosahexaenoic acid inhibits invasion of human RT112 urinary bladder and PT45 pancreatic carcinoma cells via down-modulation of granzyme B expression. J Nutr Biochem. 2012;23:452-7.

Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. J Neurooncol. 2004 Nov;70(2):217-28.

Diers AR, Dranka BP, Ricart KC, Oh JY, Johnson MS, Zhou F, et al. Modulation of mammary cancer cell migration by 15-deoxy-delta(12,14) -prostaglandin J(2): implications for anti-metastatic therapy. Biochemical Journal. 2010; 430:69–78. [PubMed: 20536428.

Dinchuk JE, Liu RQ, Trzaskos JM. COX-3: in the wrong frame in mind. Immunol Lett. 2003 Mar 3;86(1):121.

Ding Y, Tong M, Liu S, Moscow JA, Tai HH. NAD+-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) behaves as a tumor suppressor in lung cancer. Carcinogenesis 2005; 26:65–72. 20.

Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. Neuro Oncol. 2012;14 Suppl 5:v1-49.

Dommels YE, Haring MM, Keestra NG, Alink GM, van Bladeren PJ, van Ommen B. The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE2 synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. Carcinogenesis. 2003; 24:385–92).

Dong J, Dai J, Zhang M, Hu Z, Shen H. Potentially functional COX-2-1195G>A polymorphism increases the risk of digestive system cancers: a meta-analysis. J Gastroenterol Hepatol. 2010 Jun;25(6):1042-50.

Du M, Shi F, Zhang H, Xia S, Zhang M, Ma J, Bai X, Zhang L, Wang Y, Cheng S, Yang Q, Leng J. Prostaglandin E2 promotes human cholangiocarcinoma cell proliferation, migration and invasion through the upregulation of β -catenin expression via EP3-4 receptor. *Oncol Rep.* 2015 Aug;34(2):715-26.

Ensor CM, Tai HH. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995; 12:313.

Ewelt C, Goeppert M, Rapp M, Steiger HJ, Stummer W, Sabel M. Glioblastoma multiforme of the elderly: the prognostic effect of resection on survival. *J Neurooncol.* 2011.

Feitoza F. Estudo in vitro do efeito da prostaglandina E₂ na migração das células U87MG e U251MG, evidenciando a matriz extracelular e as moléculas de adesão. [(mestrado em biologia celular e tecidual)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Ferrández A, Piazuelo E, Castells A. Aspirin and the prevention of colorectal cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 26 (2012) 185–195.

Ferreira MT. Analysis of how the production and activity of PGD2 affects glioma cells. [(mestrado em biologia celular e tecidual)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin.* 2007 Nov;25(4):867-90, vii

Freedman RS, Wang E, Voiculescu S, Patenia R, Bassett RL Jr, Deavers M, Marincola FM, Yang P, Newman RA. Comparative analysis of peritoneum and tumor eicosanoids and pathways in advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Oct 1;13(19):5736-44.

Fiebich BL, Schleicher S, Spleiss O, Czygan M, Hüll M. Mechanisms of prostaglandin E2-induced interleukin-6 release in astrocytes: possible involvement of EP4-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. *J Neurochem.* 2001 Dec;79(5):950-8.

Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol.* 2010 Jan 11;188(1):11-9.

Fricke A, McClelland L, Scott G, The Pigment PGF (2alpha) receptor FP is lost in nevi and melanoma. Cell Melanoma Res. 2010 Feb;23(1):141-3.

Fujimoto A, Shingai Y, Oyama TB, Kawanai T, Hashimoto E, Koizumi K, Kimura K, Masuda T, Oyama Y: Apoptosis-inducing action of two products from oxidation of sesamol, an antioxidative constituent of sesame oil: a possible cytotoxicity of oxidized antioxidant. *Toxicol In Vitro*. 2010 24: 1720-1726.

Fukushima M, Kato T, Ota K, Arai Y, Narumiya S, Hayaishi O. 9-deoxy-delta 9-prostaglandin D₂, a prostaglandin D2 derivative with potent antineoplastic and weak smooth muscle-contracting activities. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982 Dec 15;109(3):626-33.

Fulton AM, Ma X and Kundu N. Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. *Cancer Res* 2006; 66: 9794-9797.

Fürstenberger G, Krieg P, Müller-Decker K, Habenicht AJR: What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *Int J Cancer* 2006, 119:2247–2254.

Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol*. 2004 Apr;31(2 Suppl 7):2-11.

Giese A, Hagel C, Kim EL, Zapf S, Djawaheri J, Berens ME, Westphal M. Thromboxane synthase regulates the migratory phenotype of human glioma cells. *Neuro Oncol*. 1999 Jan;1(1):3-13.

Gladson CL, Prayson RA, Liu WM. The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol*, 2010. 5:p. 33-50.

Glover JA, Hughes CM, Cantwell MM, Murray LJ. A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. *Br J Cancer*. 2011 Jun 28; 105(1):13-7.

Gomes RN, Colquhoun A. E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. *Lipids Health Dis*. 2012 Dec 11;11:171.

Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A: The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009, 30(3):377-386.

Gudis K, Tatsuguchi A, Wada K, Hiratsuka T, Futagami S, Fukuda Y, Kiyama T, Tajiri T, Miyake K, Sakamoto C. Clinical significance of prostaglandin E synthase expression in gastric cancer tissue. *Hum Pathol.* 2007 Dec;38(12):1826-35.

Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct;1(1):11-21.

Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, DuBois RN. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2003 Mar 1;63(5):906-11.

Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep.* 2008 Jan-Feb;60(1):3-11.

Hanaka H, Pawelzik SC, Johnsen JI, Rakonjac M, Terawaki K, Rasmussen A, Sveinbjörnsson B, Schumacher MC, Hamberg M, Samuelsson B, Jakobsson PJ, Kogner P, Rådmark O. Microsomal prostaglandin E synthase 1 determines tumor growth in vivo of prostate and lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Nov 3; 106(44):18757-62.

Hara A, Okayasu I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. *Acta Neuropathol.* 2004 Jul;108(1):43-8.

Hemler M, Lands WE. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem.* 1976 Sep 25;251(18):5575-9.

Holla VR, Backlund MG, Yang P, Newman RA, DuBois RN. Regulation of prostaglandin transporters in colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila).* 2008 Jul;1(2):93-9.

Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and its ligands: a review. *Domest Anim Endocrinol.* 2002 Mar;22(1):1-23.

Huang HF, Shu P, Murphy TF, Aisner S, Fitzhugh VA and Jordan ML. Significance of divergent expression of prostaglandin EP4 and EP3 receptors in human prostate cancer. *Mol Cancer Res* 2013; 11: 427-439.

Huttner A. Overview of primary brain tumors: pathologic classification, epidemiology, molecular biology, and prognostic markers. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2012 Aug;26(4):715-32.

Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Mar 18;90(6):455-60.

Ichikawa A, Sugimoto Y, Negishi M. Molecular aspects of the structures and functions of the prostaglandin E receptors. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1996;14:83-87.

Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Estimativas de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf.

Ito H, Duxbury M, Benoit E, Clancy TE, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. Prostaglandin E₂ enhances pancreatic cancer invasiveness through an ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.* 2004 Oct 15;64(20):7439-46.

Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 22;96(13):7220-5.

Jia-Jun T, Su-Mei L, Liang Y, Ju-Ke M, Ya-Kui M, Hai-Bo W, Wei X. Nimesulide inhibited the growth of hypopharyngeal carcinoma cells via suppressing Survivin expression. *Head Neck Oncol.* 2012 Mar 27;4:7.

Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J, Kraeft SK, Seyfried NT, Abe T, Chen LB, Carroll RS, Black PM. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res.* 2000 Sep 1;60(17):4926-31.

Joy AM, Beaudry CE, Tran NL, Ponce FA, Holz DR, Demuth T, Berens ME. Migrating glioma cells activate the PI3-K pathway and display decreased susceptibility to apoptosis. *J Cell Sci.* 2003 Nov 1;116(Pt 21):4409-17.

Kamei D, Murakami M, Nakatani Y, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2003 May 23;278(21):19396-405.

Kamei D, Murakami M, Sasaki Y, Nakatani Y, Majima M, Ishikawa Y, Ishii T, Uematsu S, Akira S, Hara S, Kudo I. Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contributes to tumour growth, invasion and metastasis. *Biochem J.* 2009 Dec 23; 425(2):361-71.

Kang JH, Song KH, Jeong KC, Kim S, Choi C, Lee CH, Oh SH. Involvement of Cox-2 in the metastatic potential of chemotherapy-resistant breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2011 Aug 4;11:334.

Klapan I, Katić V, Culo F, Cuk V.
Prognostic significance of plasma prostaglandin E concentration in patients with head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1992;118(4):308-13.

Kochel TJ, Fulton AM. Multiple drug resistance associated protein 4 (MRP4), prostaglandin transporter (PGT), and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) as determinants of PGE2 levels in cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015 Jan-Mar;116-117:99-103.

Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology.* 1999 Mar;29(3):688-96.

Kökoğlu E, Tüter Y, Sandıkçı KS, Yazıcı Z, Ulakoğlu EZ, Sönmez H, Ozyurt E. Prostaglandin E2 levels in human brain tumor tissues and arachidonic acid levels in the plasma membrane of human brain tumors. *Cancer Lett.* 1998 Oct 23;132(1-2):17-21.

Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochim Pol.* 2014 Oct; 61(4):639-49.

Koul R, Dubey A, Torri V, Kakumanu A, Goyal K. Glioblastoma multiforme in elderly population. *J Neurosurg.*

Kürzel F, Hagel Ch, Zapf S, Meissner H, Westphal M, Giese A. Cyclo-oxygenase inhibitors and thromboxane synthase inhibitors differentially regulate migration arrest,

growth inhibition and apoptosis in human glioma cells. *Acta Neurochir (Wien)*. 2002 Jan;144(1):71-87.

Lalier L, Cartron PF, Pedelaborde F, Olivier C, Loussouarn D, Martin SA, Meflah K, Menanteau J, Vallette FM. Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene*. 2007 Jul 26;26(34):4999-5009.

Lanzetta G, Minniti G. Treatment of glioblastoma in elderly patients: an overview of current treatments and future perspective. *Tumori*. 2010 Sep-Oct; 96(5):650-8.

Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, Haapasalo H, Raitanen J, Jääskeläinen J, Auvinen A.. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol*. 2007 Jul; 9(3): 319-325.

Larsson K, Kock A, Idborg H, Arsenian Henriksson M, Martinsson T, Johnsen JI, Korotkova M, Kogner P, Jakobsson PJ. COX/mPGES-1/PGE2 pathway depicts an inflammatory-dependent high-risk neuroblastoma subset. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jun 30;112(26):8070-5.

Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996;84:359-69.

Le Clainche C, Carlier MF. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev*. 2008 Apr;88(2):489-513.

Lee G, Ng HT. Clinical evaluations of a new ovarian cancer marker, COX-1. *Int J Gynaecol Obstet*. 1995 Jul;49 Suppl:S27-32.

Leslie CC. Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004; 70:373-376.
 Li W, Xu RJ, Lin ZY, Zhuo GC, Zhang HH. Effects of a cyclooxygenase-1-selective inhibitor in a mouse model of ovarian cancer, administered alone or in combination with ibuprofen, a nonselective cyclooxygenase inhibitor. *Med Oncol*. 2009;26(2):170-7.

Li F, Liu Y, Chen H, Liao D, Shen Y, Xu F, Wang J. EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Mar 7;30:27.

Liu B, Qu L, Yan S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int.* 2015 Nov 5;15:106.
 Loh JK, Hwang SL, Lieu AS, et al. The alteration of prostaglandin E₂ levels in patients with brain tumors before and after tumor removal. *J Neurooncol* 2002;57:147–50.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016 Jun;131(6):803-20.

Ma X, Kundu N, Rifat S, Walser T, Fulton AM. Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2006 Mar 15;66(6):2923-7.

McDonough W, Tran N, Giese A, Norman SA, Berens ME. Altered gene expression in human astrocytoma cells selected for migration: I. Thromboxane synthase. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 1998;57(5):449–455.

Mariani L, Beaudry C, McDonough WS, Hoelzinger DB, Demuth T, Ross KR, Berens T, Coons SW, Watts G, Trent JM, Wei JS, Giese A, Berens ME. Glioma cell motility is associated with reduced transcription of proapoptotic and proliferation genes: a cDNA microarray analysis. *J Neurooncol.* 2001 Jun;53(2):161-76.

Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 2004 20(15):2471-2472

Mattila S, Tuominen H, Koivukangas J, Stenback F. The terminal prostaglandin synthases mPGES-1, mPGES-2, and cPGES are all overexpressed in human gliomas. *Neuropathology.* 2009;29:156–165.

Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem.* 1988 Mar 15;263(8):3550-3.

McCarthy BJ, Kruchko C; Central Brain Tumor Registry of the United States. Consensus conference on cancer registration of brain and central nervous system tumors. *Neuro Oncol.* 2005 Apr;7(2):196-201.

Mitchell K, Svenson KB, Longmate WM, Gkirtzmanaki K, Sadej R, Wang X, Zhao J, Eliopoulos AG, Berditchevski F, Dipersio CM. Suppression of integrin alpha3beta1 in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells. *Cancer Res.* 2010 Aug 1;70(15):6359-67.

Mujic A, Hunn A, Taylor AB, Lowenthal RM. Extracranial metástases of a glioblastoma multiforme to the pleura, small bowel and pancreas. *J Clin Neurosci* 2006; 13: 677-81.

Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2000 Oct 20; 275(42):32783-92.

Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K, Kudo I. Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenase-1 and -2. *J Biol Chem* 2003; 278: 37937-37947.

Murata T, Lin MI, Aritake K, Matsumoto S, Narumiya S, Ozaki H, Urade Y, Hori M, Sessa WC. Role of prostaglandin D2 receptor DP as a suppressor of tumor hyperpermeability and angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 16;105(50):20009-14.

Murakami M, Kudo I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res.* 2004 Jan;43(1):3-35.

Murakami M, Kudo I. Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 943-954.

Mutoh M, Takahashi M, Wakabayashi K. Roles of prostanoids in colon carcinogenesis and their potential targeting for cancer chemoprevention. *Curr Pharm Des.* 2006;12(19):2375-82.

Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, Shoji Y, Takahashi M, Kawamori T, Tani K, Kobayashi M, Maruyama T, Kobayashi K, Ohuchida S, Sugimoto Y, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 2002 Jan 1;62(1):28-32.

Narumiya S, Fitzgerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(1):25-30.

Narumiya S, Ohno K, Fukushima M, Fujiwara M. Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 in nuclei. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987 Jul;242(1):306-11.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1193-226.

Needleman P, Isakson PC. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol Suppl.* 1997 Jul;49:6-8.

Nomura T, Lu R, Pucci ML, Schuster VL. The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. *Mol Pharmacol* 2004; 65:973–8.

Ochs K, Ott M, Rauschenbach KJ, Deumelandt K, Sahm F, Opitz CA, von Deimling A, Wick W, Platten M. Tryptophan-2,3-dioxygenase is regulated by prostaglandin E₂ in malignant glioma via a positive signaling loop involving prostaglandin E receptor-4. *J Neurochem.* 2015 Dec 27.

Ohgaki, H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53.

Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013 Feb 15;19(4):764-72.

Oksuz E, Atalar F, Tanrıverdi G, Bilir A, Shahzadi A, Yazıcı Z. Therapeutic potential of cyclooxygenase-3 inhibitors in the management of glioblastoma. *J Neurooncol.* 2016 Jan;126(2):271-8.

Osman WM, Youssef NS. Combined use of COX-1 and VEGF immunohistochemistry refines the histopathologic prognosis of renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Jul 1;8(7):8165-77.

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2014 Jul;16(7):896-913.

Panagopoulos, AT. Avaliação da função dos eicosanoides no desenvolvimento e na progressão das neoplasias cerebrais. [(Doutorado em Pesquisa em Cirurgia)] São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2013.

Pan MR, Hou MF, Chang HC, Hung WC. Cyclooxygenase-2 up-regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008 Apr 25;283(17):11155-63.

Pan Y, Jiang Y, Tan L, Ravoori MK, Gagea M, Kundra V, Fischer SM, Yang P. Deletion of cyclooxygenase-2 inhibits K-ras induced lung carcinogenesis. *Oncotarget.* 2015 Nov 17;6(36):38816-26.

Paulitschke V, Gruber S, Hofstätter E, Haudek-Prinz V, Klepeisz P, Schicher N, Jonak C, Petzelbauer P, Pehamberger H, Gerner C, Kunstfeld R. *PLoS One.* 2012;7(9):e46103. Proteome analysis identified the PPAR γ ligand 15d-PGJ2 as a novel drug inhibiting melanoma progression and interfering with tumor-stroma interaction.

Park JM, Kanaoka Y, Eguchi N, Aritake K, Grujic S, Materi AM, Buslon VS, Tippin BL, Kwong AM, Salido E, French SW, Urade Y, Lin HJ. Hematopoietic prostaglandin D synthase suppresses intestinal adenomas in *Apc*^{Min/+} mice. *Cancer Res.* 2007;67:881–889.

Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clin Immunol.* 2006. 119(3): p. 229-40.

Payne CA, Maleki S, Messina M, O'Sullivan MG, Stone G, Hall NR, Parkinson JF, Wheeler HR, Cook RJ, Biggs MT, Little NS, Teo C, Robinson BG, McDonald KL. Loss of prostaglandin D2 synthase: a key molecular event in the transition of a low-grade astrocytoma to an anaplastic astrocytoma. *Mol Cancer Ther.* 2008 Oct;7(10):3420-8.

Payner T, Leaver HA, Knapp B, Whittle IR, Trifan OC, Miller S, Rizzo MT. Microsomal prostaglandin E synthase-1 regulates human glioma cell growth via prostaglandin E(2)-dependent activation of type II protein kinase A. *Mol Cancer Ther.* 2006 Jul;5(7):1817-26.

Persano L, Rampazzo E, Basso G, Viola G. Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem Pharmacol.* 2013 Mar 1;85(5):612-22.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.

Pham H, Chen M, Li A, King J, Angst E, Dawson DW, Park J, Reber HA, Hines OJ, Eibl G.

Loss of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase increases prostaglandin E2 in pancreatic tumors. *Pancreas*. 2010 Apr;39(3):332-9.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006; 9; 157–173.

Piva R, Gianferretti P, Ciucci A, Taulli R, Belardo G, Santoro MG. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin Blood. 2005 Feb 15;105(4):1750-8.

Prayson RA, Castilla EA, Vogelbaum MA, Barnett GH. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by immunohistochemistry in glioblastoma multiforme. *Ann Diagn Pathol*. 2002 Jun;6(3):148-53.

Rådmark O, Samuelsson B. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and 5-lipoxygenase: potential drug targets in cancer. *J Intern Med*. 2010 Jul;268(1):5-14.

Ramos KL, Colquhoun A. Protective role of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the metabolic response of C6 rat glioma cells to polyunsaturated fatty acid exposure. *Glia*. 2003 Aug;43(2):149-66.

Rasmussen, R. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications* Springer Press, Heidelberg; 2001. page 21-34.

Raza SM1, Fuller GN, Rhee CH, Huang S, Hess K, Zhang W, Sawaya R. Identification of necrosis-associated genes in glioblastoma by cDNA microarray analysis. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):212-21.

Reader J, Holt D, Fulton A. Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2011 Dec;30(3-4):449-63.

Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, Wijnholds J, Borst P.

The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 5;100(16):9244-9.

Robert M, Wastie M. Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases. *Biomed Imaging Interv J* 2008; 4: e3.

Robertson T, Koszyca B, Gonzales M. Overview and recent advances in neuropathology. Part 1: Central nervous system tumours. *Pathology*, v. 43, p. 88-92, 2011.

Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S29-34.

Sales KJ, Boddy SC, Jabbour HN, F-prostanoid receptor alters adhesion, morphology and migration of endometrial adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2008 Apr 10;27(17):2466-77. Epub 2007 Oct 29.

Samuelsson B: New trends in prostaglandin research. In Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol 1, (Ed.) Samuelsson B, Paoletti R, Raven Press, New York, 1976, 1–6.

Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandin E synthase-1: A novel therapeutic target. *Pharmacol Rev.* 2007; 59:207–224.

Sasaki Y, Nakatani Y, Hara S. Role of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) -derived prostaglandin E2 in colon carcinogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015 Sep;121(Pt A):42-5.

Serini S, Piccioni E, Merendino N, Calviello G. Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. *Apoptosis*. 2009 Feb;14(2):135-52.
Seo T, Tatsuguchi A, Shinji S, Yonezawa M, Mitsui K, Tanaka S, Fujimori S, Gudis K, Fukuda Y, Sakamoto C. Microsomal prostaglandin E synthase protein levels correlate with prognosis in colorectal cancer patients. *Virchows Arch.* 2009 Jun; 454(6):667-76.

Schauff AK, Kim EL, Leppert J, Nadrowitz R, Wuestenberg R, Brockmann MA, et al. Inhibition of invasion-associated thromboxane synthase sensitizes experimental gliomas to gamma-radiation. *Journal of Neuro-Oncology*. 2009;91(3):241–249.

Scherer, H.J. A Critical Review: The Pathology of Cerebral Gliomas. *J Neurol Psychiatry*, 1940. 3(2): p. 147-77.

Scher JU, Pillinger MH. 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol.* 2005 Feb;114(2):100-9.

Schneider C, Pozzi A. Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2011 Dec;30(3-4):277-94.

Scott G, Jacobs S, Leopardi S, Anthony FA, Learn D, Malaviya R, Pentland A, et al. Effects of PGF(2alpha) on human melanocytes and regulation of the FP receptor by ultraviolet radiation. *Exp Cell Res.* 2005; 304:407–416.

Schuster VL. Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002 Aug;68-69:633-47.

Shabason JE, Tofilon PJ, Camphausen K. Grand rounds at the National Institutes of Health: HDAC inhibitors as radiation modifiers, from bench to clinic. *J Cell Mol Med.* 2011 Dec; 15(12).

Shaftel SS, Olschowka JA, Hurley SD, Moore AH, O'Banion MK. COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Nov 26;119(2):213-5.

Shang S, Liao X, Shen Z, Qiu J, Shao S, Ding L, Wang D, Yang G, Zhang Y. Expression of prostaglandin transporter in colorectal cancer tissues and its relationship with clinicopathological features. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi.* 2015 Mar;18(3):277-81.

Sharma V, Dixit D, Ghosh S, Sen E. COX-2 regulates the proliferation of glioma stem like cells. *Neurochem Int.* 2011 Oct;59(5):567-71.

Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E₂ increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2001 May 25;276(21):18075-81.

Shin SW, Seo CY, Han H, Han JY, Jeong JS, Kwak JY, Park JI. 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5414-25.

Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(11):4375-81.

Silbergeld DL, Chicoine MR. Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain. *J Neurosurg.* 1997 Mar;86(3):525-31.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004 Sep;56(3):387-437.

Simpson JR, Horton J, Scott C, et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993;26:239–44.

Singh B, Berry JA, Shoher A, Ayers GD, Wei C, Lucci A. COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene.* 2007 May 31;26(26):3789-96. Epub 2007 Jan 8.

Smartt HJ, Greenhough A, Ordóñez-Morán P, Al-Kharusi M, Collard TJ, Mariadason JM, Huelsken J, Williams AC, Paraskeva C. β -catenin negatively regulates expression of the prostaglandin transporter PGT in the normal intestinal epithelium and colorectal tumour cells: a role in the chemopreventive efficacy of aspirin? *Br J Cancer.* 2012 Oct 23;107(9):1514-7.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthase (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 1996 Dec 27;271(52):33157-60.
Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69:145-82.

Smith WL, Urade Y, Jakobsson PJ. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev.* 2011 Oct 12;111(10):5821-65.

Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, Oshima M, Taketo MM. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in *apc(delta 716)* knockout mice. *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1048-51.

Stringfellow DA, Fitzpatrick FA. Prostaglandin D2 controls pulmonary metastasis of malignant melanoma cells. *Nature* 1979; 282: 76–8.

Subbaramaiah K, Hudis CA, Dannenberg AJ. The prostaglandin transporter regulates adipogenesis and aromatase transcription. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011 Feb;4(2):194-206.

Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* 2007;282(16):11613–11617.

Surh YJ, Na HK, Park JM, Lee HN, Kim W, Yoon IS, Kim DD. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochem Pharmacol.* 2011 Nov 15;82(10):1335-51.

Tai HH. Prostaglandin catabolic enzymes as tumor suppressors. *Cancer Metastasis Rev.* 2011 Dec;30(3-4):409-17

Tai HH, Tong M, Ding Y. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) and lung cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007 May;83(3):203-8.

Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandina E₂ synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E₂ biosynthesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 32775–32782.

Thiel A, Ganesan A, Mrena J, Junnila S, Nykänen A, Hemmes A, Tai HH, Monni O, Kokkola A, Haglund C, Petrova TV, Ristimäki A. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 15;15(14):4572-80.

Tiano HF, Loftin CD, Akunda J, Lee CA, Spalding J, Sessoms A, Dunson DB, Rogan EG, Morham SG, Smart RC, Langenbach R. Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Res.* 2002 Jun 15;62(12):3395-401.

Timoshenko AV, Xu G, Chakrabarti S, Lala PK, Chakraborty C. Role of prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2003 Oct 1;289(2):265-74.

Trindade-da-Silva CA, Reis CF, Vecchi L, Napimoga MH, Sperandio M⁴, Matias Colombo BF, Alves PT, Ward LS, Ueira-Vieira C, Goulart LR. 15-Deoxy-Δ(12,14)-prostaglandin J₂ Induces Apoptosis and Upregulates SOCS3 in Human Thyroid Cancer Cells. *PPAR Res.* 2016;2016:4106297.

Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002 Aug;68-69:535-56.

Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 1998 Nov;69(3):168-72.

Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn).* 2014;18(5):307-12.

Vaid M, Singh T, Prasad R, Kappes JC, Katiyar SK. Therapeutic intervention of proanthocyanidins on

the migration capacity of melanoma cells is mediated through PGE₂ receptors and β-catenin signaling molecules. Am J Cancer Res. 2015 Oct 15;5(11):3325-38.

Vaid M, Singh T, Prasad R, Kappes JC, Katiyar SK. Therapeutic intervention of proanthocyanidins on the migration capacity of melanoma cells is mediated through PGE2 receptors and β-catenin signaling molecules. Am J Cancer Res. 2015 Oct 15;5(11):3325-38.

Vaish V, Sanyal SN. Role of Sulindac and Celecoxib in the regulation of angiogenesis during the early neoplasm of colon: Exploring PI3-K/PTEN/Akt pathway to the canonical Wnt/b-catenin signaling. Biomedicine & Pharmacotherapy 66 (2012) 354–367.

Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Scrideli CA, Paçó-Larson ML, Carlotti CG Jr. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. BMC Mol Biol. 2009 Mar 3;10:17.

Van Dorpd, Beertuis RK, Nugteren DH, Vonkeman H. Enzymatic conversion of all-cis-polyunsaturated fatty acids into prostaglandins. Nature. 1964 Aug 22;203:839-41.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998;38:97-120.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell. 2010; 17:98-110.

von Euler U. S. On specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). J Physiol. 1936 Nov 6;88(2):213-34..

von Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. J Physiol. 1931 Jun 6;72(1):74-87.

Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. Gut. 2006 Jan;55(1):115-22.

Wang D, DuBois RN. Measurement of eicosanoids in cancer tissues. Methods Enzymol. 2007;433:27-50.

Wang D, DuBois RN. Inflammatory mediators and nuclear receptor signaling in colorectal cancer. *Cell Cycle.* 2007 Mar 15;6(6):682-5. Epub 2007 Mar 21.

Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010 Mar; 10(3): 181–193.

Wang D, DuBois RN. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptors in chronic inflammation and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2010 Sep;39(3):697-707.

Wang X, Lin H, Gu Y. Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids Health Dis.* 2012 Feb 14;11:25.

Wakimoto N, Wolf I, Yin D, O'Kelly J, Akagi T, Abramovitz L, Black KL, Tai HH, Koeffler HP. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress glioma via 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Cancer Res.* 2008 Sep 1;68(17):6978-86.

Wilson AJ, Fadare O, Beeghly-Fadiel A, Son DS, Liu Q, Zhao S, Saskowski J, Uddin MJ, Daniel C, Crews B, Lehmann BD, Pietenpol JA, Crispens MA, Marnett LJ, Khabele D. Aberrant over-expression of COX-1 intersects multiple protumorigenic pathways in high grade serous ovarian cancer. *Oncotarget.* 2015 Aug 28;6(25):21353-68.

Wolf I, O'Kelly J, Rubinek T, Tong M, Nguyen A, Lin BT, Tai HH, Karlan BY, Koeffler HP. Prostaglandin catabolic enzymes as tumor suppressors, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. *Cancer Research.* 2006; 66(15):7818–7823.

Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A. Cancer Res. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. 1998 Nov 15;58(22):4997-5001.

Wu J, Zhang Y, Frilot N, Kim JI, Kim WJ, Daaka Y. Prostaglandin E₂ regulates renal cell carcinoma invasion through the ep4 receptor-rap gtpase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 2011 Sep 30;286(39):33954-62.

Xu Y, Qian SY. Anti-cancer activities of ω -6 polyunsaturated fatty acids. *Biomed J.* 2014 May-Jun;37(3):112-9.

Xu K, Wang L, Shu HK. COX-2 overexpression increases malignant potential of human glioma cells through Id1. *Oncotarget.* 2014 Mar 15; 5(5):1241-52.

Xu S, Zhang Z, Ogawa O, Yoshikawa T, Sakamoto H, Shibasaki N, Goto T, Wang L, Terada N. An EP4 antagonist ONO-AE3-208 suppresses cell invasion, migration, and metastasis of prostate cancer. *Cell Biochem Biophys.* 2014 Sep;70(1):521-7.

Yagami T, Koma H, Yamamoto Y. Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. *Mol Neurobiol.* 2015 Sep 2.

Yan M, Rerko RM, Platzer P, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF- β -induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 17468-73

Yang P, Jiang Y, Fischer SM. Prostaglandin E3 metabolism and cancer. *Cancer Lett.* 2014 Jun 28;348(1-2):1-11.

Yamanaka Y, Shiraki K, Inoue T, Miyashita K, Fuke H, Yamaguchi Y, Yamamoto N, Ito K, Sugimoto K, Nakano T. COX-2 inhibitors sensitize human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Mol Med.* 2006 Jul;18(1):41-7.

Yoshimura R, Sano H, Masuda C, Kawamura M, Tsubouchi Y, Chargui J, Yoshimura N, Hla T, Wada S. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer.* 2000 Aug 1;89(3):589-96.

Yoshimoto A, Kasahara K, Kawashima A, Fujimura M, Nakao S. Characterization of the prostaglandin biosynthetic pathway in non-small cell lung cancer: a comparison with small cell lung cancer and correlation with angiogenesis, angiogenic factors and metastases. *Oncol Rep.* 2005 Jun;13(6):1049-57.

Yoshizato K, Zapf S, Westphal M, Berens ME, Giese A. Thromboxane synthase inhibitors induce apoptosis in migration-arrested glioma cells. *Neurosurgery.* 2002 Feb;50(2):343-54.

Zander T, Kraus JA, Grommes C, Schlegel U, Feinstein D, Klockgether T, Landreth G, Koenigsknecht J, Heneka MT. Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor PPARgamma. *J Neurochem.* 2002 Jun;81(5):1052-60.

Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse M, Zupanc T, Stajer D. Cyclooxygenase in normal human tissues--is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9B):3753-63.

Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells

Mercedes Martín-Rufián · Renata Nascimento-Gomes · Ana Higuero · Amanda R. Crisma · José A. Campos-Sandoval · María C. Gómez-García · Carolina Cardona · Tzuling Cheng · Carolina Lobo · Juan A. Segura · Francisco J. Alonso · Monika Szeliga · Jan Albrecht · Rui Curi · Javier Márquez · Alison Colquhoun · Ralph J. DeBerardinis · José M. Matés

Received: 21 June 2013 / Revised: 12 November 2013 / Accepted: 13 November 2013 / Published online: 26 November 2013
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Mitochondrial glutaminase (GA) plays an essential role in cancer cell metabolism, contributing to biosynthesis, bioenergetics, and redox balance. Humans contain several GA isozymes encoded by the *GLS* and *GLS2* genes, but the specific roles of each in cancer metabolism are still unclear. In this study, glioma SFxL and LN229 cells with silenced isoenzyme glutaminase KGA (encoded by *GLS*) showed lower survival ratios and a reduced GSH-dependent antioxidant capacity. These *GLS*-silenced cells also demonstrated induction of apoptosis indicated by enhanced annexin V binding capacity and caspase 3 activity. *GLS* silencing was associated with decreased mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) (JC-1 dye test), indicating that apoptosis was mediated by

mitochondrial dysfunction. Similar observations were made in T98 glioma cells overexpressing glutaminase isoenzyme GAB, encoded by *GLS2*, though some characteristics (GSH/GSSG ratio) were different in the differently treated cell lines. Thus, control of GA isoenzyme expression may prove to be a key tool to alter both metabolic and oxidative stress in cancer therapy. Interestingly, reactive oxygen species (ROS) generation by treatment with oxidizing agents: arsenic trioxide or hydrogen peroxide, synergizes with either KGA silencing or GAB overexpression to suppress malignant properties of glioma cells, including the reduction of cellular motility. Of note, negative modulation of *GLS* isoforms or GAB overexpression evoked lower c-myc and bcl-2 expression, as well as higher pro-apoptotic bid expression. Combination of modulation of GA expression and treatment with oxidizing agents may become a therapeutic strategy for intractable cancers and provides a multi-angle evaluation system for anti-glioma pre-clinical investigations.

Key message

- Silencing *GLS* or overexpressing *GLS2* induces growth inhibition in glioma cell lines.
- Inhibition is synergistically enhanced after arsenic trioxide (ATO) or H_2O_2 treatment.
- Glutathione levels decrease in *GLS*-silenced cells but augment if *GLS2* is overexpressed.
- ROS synergistically inhibit cell migration by *GLS* silencing or *GLS2* overexpression.
- c-myc, bid, and bcl-2 mediate apoptosis resulting from *GLS* silencing or *GLS2* overexpression.

M. Martín-Rufián · A. Higuero · J. A. Campos-Sandoval · M. C. Gómez-García · C. Cardona · C. Lobo · J. A. Segura · F. J. Alonso · J. Márquez · J. M. Matés (✉)
 Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Sciences, Campus de Teatinos, University of Málaga,
 29071 Málaga, Spain
 e-mail: jmatés@uma.es

R. Nascimento-Gomes · A. Colquhoun
 Department of Cell and Developmental Biology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

M. Szeliga · J. Albrecht
 Department of Neurotoxicology, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

A. R. Crisma · R. Curi
 Department of Physiology and Biophysics, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

T. Cheng · R. J. DeBerardinis
 Children's Medical Center Research Institute, University of Texas-Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390-8502, USA

Keywords Apoptosis · Cancer · Glioma · Glutaminase · Glutathione · ROS

Introduction

Mammalian glutaminases (GA) catalyze the hydrolytic deamidation of glutamine to glutamate [1], which is further catabolized in the Krebs cycle for the production of ATP, nucleotides, certain amino acids, and lipids [2]. Although there is no doubt about the importance of GA in brain [3, 4], its key role in cancer [5, 6] and oxidative stress has been recently highlighted [7, 8]. In fact, several recent findings support the notion of GA as a multifaceted protein involved in other functions besides glutamate generation from glutamine [1, 5, 9]. Of outstanding interest, the presence of multiple GA transcripts has been demonstrated even in a single cancer cell type [10]. In humans, the GA family consists of two main members: the *GLS* gene encodes two isoforms, known as kidney (K-type) glutaminase or KGA, and glutaminase C or GAC [4]. These two isoenzymes are usually referred to as GLS [8]. On the other hand, the *GLS2* gene codes for liver (L-type) isozymes, named LGA, as well as for a longer isoform named GAB [11, 12]. Both isoenzymes are designated collectively as GLS2 [8]. GLS has been demonstrated to be regulated by oncogenes and to support tumor cell growth [5, 6, 9, 13, 14]. In contrast, GLS2 is a transcriptional target of p53 and has been argued to have tumor suppressor properties, and re-expressing it in p53-deficient cells limits malignancy [7, 15]. It is unclear why these isozymes have such different biological properties despite their ability to catalyse the same enzymatic reaction.

The process of oncogenic transformation places energy demands on cancer cells to support proliferation, expansion, and invasion [16, 17]. Deregulated tumor metabolism is a critical part of oncogenesis and may be targeted for therapeutic benefits [6], including glioma treatment [18]. Both glutamine addiction and GLS activity are critical for c-myc-mediated oncogenesis [9, 14, 19, 20]; they have been linked to glutamine synthetase requirement [17], and proposed as attractive targets for therapeutic intervention [5, 6, 8]. The Warburg effect (increased aerobic glycolysis) [16] and glutaminolysis (increased mitochondrial activity from glutamine catabolism) [5] are well-known hallmarks of cancer [21], and are accompanied by increased lactate production [22] as well as increased generation of reactive oxygen species (ROS) [23–25]. Arsenic trioxide (ATO) and hydrogen peroxide (H_2O_2) can depolarise mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), increase intracellular ROS production, and induce apoptosis [24]. Based on these observations, and on the fact that GLS has oncogenic properties [14], and GLS2 isoenzyme can be designed as a tumor suppressor [15] and a ROS regulator [7], we sought to compare and contrast the effects of *GLS* (KGA and GAC) silencing and GLS2 (GAB) overexpression on malignant properties of tumor cells, alone and when combined with oxidative stress. We used glioma cell lines as a model, because several such cell lines have been

shown to be glutamine dependent in culture and to use glutamine as a major substrate for anaplerosis and oxidative metabolism [13]. For *GLS* silencing experiments, we used the glioblastoma cell lines LN229 and SFxL. Both of these cell lines use glutamine as an anaplerotic precursor for the TCA cycle, and both display significant reductions in ammoniagenesis, cell proliferation, and tumor growth upon *GLS* silencing [13]. On the other hand, human glioblastoma T98G cell line expresses high amounts of *GLS* transcripts, while *GLS2* transcripts are hardly detectable in these cells [12]. Interestingly, transfection of T98G cells with a GAB cDNA sequence diminished cell proliferation and survival [12].

Methods

Cell lines, culture conditions, stable transfections and RNA interference

All cell lines were tested for mycoplasma contamination. SFxL and LN229 cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, and 6 mM L-glutamine as previously described [13]. All RNA interference (RNAi) experiments used pools of cells. Vectors for RNAi, lentiviral particles, and details have been described previously [13]. Of note, SFxL and LN229 control cells are expressing a non-targeting shRNA. Stably infected pools with adequate silencing were maintained in 1 μ g/mL puromycin. In all stable knockdown experiments, very few detached cells were noted in the culture, and these were not included in growth and viability counts. T98G human glioblastoma cells were purchased from American Type Culture Collection and were maintained in minimum essential medium, supplemented with 10 % FBS, 1 % non-essential amino acids, 100 IU/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, all supplied by Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 95 % air and 5 % CO₂. T98G-GAB and T98G-pcDNA cell lines were obtained by stable transfection of T98G cells with a full cDNA sequence encoding human GAB or empty pcDNA3 vector, respectively, exactly as described previously [12]. The culture medium for the polyclonal populations of T98G-GAB and T98G-pcDNA cells containing the neomycin-resistance gene was supplemented with 0.5 mg/mL geneticin (Sigma-Aldrich). Relative baseline expression of *GLS* and *GLS2* in all assayed cell lines shows that SFxL and LN229 *GLS*-silenced cell lines significantly diminished *GLS* expression, and T98G-GAB cell line significantly overexpressed *GLS2* (Fig. 1).



Fig. 1 Expression of *GLS* and *GLS2* in assayed cell lines. Western blots show that SFxL and LN229 *GLS* silenced cell lines diminished *GLS* expression, and T98G-GAB cell line effectively overexpressed *GLS2* isoform. Transacted controls were equivalent to non-transfected cells for all type of cells. Data are from one of three representative experiments. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as loading control

Cell viability assays

For viability assays, 5×10^4 cells in 100 μL of medium were seeded in a 96-well culture plate. Next, the cells were exposed to increasing (0–300 μM) concentrations of ATO (Sigma-Aldrich) or H_2O_2 (Sigma-Aldrich) for 15 min, 1, 6, 24, 48 and 72 h. After treatments, the medium was removed, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and cell number was evaluated. In brief, 10 μL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) (Promega, Southampton, UK) was added to each well (0.5 mg/mL), and then the plates were incubated at 37 °C for 3 h. The absorbance at 570 nm was measured using an Elisa BioRad Microplate Reader (BioRad, Hercules, CA, USA).

Annexin V and caspase 3 activity assays

Apoptosis was quantified by flow cytometry after staining cells with R-phycocerythrin (R-PE)-labelled annexin V (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) and propidium iodide (PI). After 48 h of ATO treatment (5 μM for SFxL and LN229 pairs, and 50 μM for T98G derivative cells), 1×10^6 cells/mL were harvested and centrifuged at 900×g for 5 min; the pellets were washed twice with PBS and resuspended in 100 μl of annexin V binding buffer (0.14 M NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 0.01 M HEPES pH 7.4). Annexin V (5 μl) was added to the samples and incubated in the dark for 30 min. For PI assay (Sigma-Aldrich), the same amount of cells was washed with PBS and then resuspended in 500 μl of PBS containing 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A, 0.1 % Triton X-100 and PI (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Untreated cells were used as control for double staining. Samples were kept on ice after incubation until fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was performed, and apoptosis evaluated based on the percentage of annexin V-positive cells. Annexin V can be detected in both the early and late stages of apoptosis. PI enters the cell in late apoptosis or necrosis. Early apoptosis is defined by annexin V⁺/PI⁻ staining, late apoptosis is defined by annexin V⁺/PI⁺ staining and necrosis is defined by annexin V⁻/PI⁺ staining. Fluorimetric assay of caspase-3 activity was performed

according to the instructions of the manufacturer without modifications (Promega, Madison, Wisconsin, USA).

Evaluation of mitochondrial membrane potential

$\Delta\Psi_m$ was assessed using a sensitive fluorescent probe 5,50,6,6-0-tetrachloro-1,10,3,30-tetraethylbenzamidazolocarbocyanine iodide (JC-1, Invitrogen), calculated as the ratio of fluorescence intensities at 640±30 nm and 525±20 nm (640/525), with excitation at 485 nm and a beam splitter at 505 nm. Red emission from the dye is attributed to a potential-dependent aggregation of JC-1 in the mitochondria. Green fluorescence reflects the monomeric form of JC-1, appearing in the cytoplasm after mitochondrial membrane depolarization. 0.25–0.5×10⁶ cells were grown on 25-cm² flasks, followed by ATO (2.5 μM , 48 h) or H_2O_2 (200 μM , 1 h) treatment. Cells were then incubated with 1.5 mM JC-1 dye diluted in culture medium at 37 °C for 30 min. Cells were washed with PBS and analyzed immediately using a FACScalibur (Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ Franklin Lakes, NJ, USA).

Intracellular antioxidant levels

Total glutathione (GSH+GSSG), oxidized glutathione (GSSG) and reduced glutathione (GSH) were measured spectrophotometrically by the glutathione reductase (GR) recycling assay at 412 nm in the presence of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) (Sigma-Aldrich). 0.75×10⁶ cells were grown on 25-cm² flasks suspensions and left untreated or were treated with different concentrations of ATO or H_2O_2 . For SFxL, SFxL-GLS(-), LN229, LN229-GLS(-) cells, 2.5 μM ATO (24 h), and 200 μM H_2O_2 (1 h) were used. For T98G, T98G-GAB, T98G-pcDNA cells, 5 μM ATO (24 h) and 300 μM H_2O_2 (1 h) were used. For sample preparation, cells were trypsinized and washed twice in cold PBS, and then resuspended to the same volume in PBS, lysed in PBS supplemented with 0.1 % Triton X-100, 0.6 % sulfosalicylic acid, vortexed, and then incubated 30 min at 4 °C. After centrifugation for 4 min at 3,000×g, supernatant was recovered and divided in two aliquots: one was conserved at 4 °C for GSH+GSSG quantification, the other one was treated with 2-vinylpyridine ($C_f=5\%$) during 1 h at room temperature (RT), and triethanolamine ($C_f=1\%$) during 10 min at RT to mask the GSH present in the extract and prevent its measurement [26]. Using a 96-well culture plate, 20 μl of the supernatant was added to 120 μl of DTNB reagent (0.040 g of DTNB dissolved in 10 mL of PBS). This was mixed and incubated for 30 s at RT. Then, 60 μl of 1 mM NADPH was added, and the absorbance was read at 412 nm, using an Elisa BioRad Microplate Reader (BioRad, Hercules, CA, USA). The amount of GSH was obtained by subtracting the amount of GSSG from that of total glutathione.

Transwell migration assay

Migration assays were performed using a 24-well Boyden chamber plate with 8-μm pore size polycarbonate membrane filters (BD- Biosciences San Jose, CA, USA). SFxL, SFxL-GLS(−), LN229, LN229-GLS(−) cells (2×10^4 /well), and T98G, T98G-GAB, T98G-pcDNA cells (4×10^4 /well) were placed in the upper part of the Boyden chamber containing DMEM and 10 % FBS, the lower chamber also contained DMEM and 10 % FBS. When treated cells were assayed, after a period of cell adhesion (12 h) the medium was changed to introduce the oxidizing agents (2.5 μM ATO for SFxL and LN229 cells, and 5 μM ATO for T98G cells, 24 or 48 h; and 1 μM H₂O₂ for SFxL and LN229 cells, and 2 μM H₂O₂ for T98G cells, 24 h) to both compartments of the chamber. The culture media was changed daily (ATO) or every 12 h (H₂O₂). After incubation, the cells on the membrane filter were fixed with methanol and stained with 0.05 % crystal violet for 30 min. The cells on the upper surface of the filter were removed with a cotton swab. The membranes were then rinsed in PBS until excess stain was removed. The membranes were then air-dried for 20 min. The migratory cells were determined by counting the cells that migrated to the lower side of the filter by bright field microscopy at $\times 200$ magnification. Leica model SP5 II and Nikon model Optiphot-II microscopes, with $\times 20$ objectives, were used to examine the cells, with Leica LAS AF and Nikon Image Pro plus image acquisition software, respectively. Ten random fields were counted for each filter, and each sample was assayed in triplicate.

Protein expression

The cells were harvested and washed in PBS, kept in ice and lysed in RIPA buffer supplemented with a Complete Protease Inhibitor kit (Roche, Indianapolis, IN, USA). Lysates were centrifuged at 10,000×g for 10 min at 4 °C, and the supernatants were collected and stored at −80 °C. Protein concentration was determined using the Bradford Protein Assay Kit (BioRad, Hercules, CA, USA). After heating for 5 min in boiling water, 25 μg of protein was resolved on 12 % polyacrylamide-SDS gels and then electrotransferred to nitrocellulose membranes. Membranes were washed in TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 500 mM NaCl, containing 0.1 % Tween 20) and blocked for 1 h in TBST containing 0.5 % Tween 20 and 5 % dried milk, or 5 % bovine serum albumin (BSA). The following antibodies were purchased: c-myc (Abcam, Cambridge, UK), bcl-2 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), bid (Cell Signaling), and used as recommended by suppliers. After incubation with respective primary antibodies, membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich), for 1 h at RT with gentle rocking, and visualized on Kodak X-ray film using an enhanced chemiluminescence (ECL)

detection system (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA). The membranes were stripped for 30 min in Stripping Buffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.7 % β-mercaptoethanol, 2 % SDS) and re-probed with anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody as a loading control (Sigma-Aldrich). Independent experiments validated that this stripping procedure did not lead to loss of signal.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean±SD from independent experiments. Statistical analysis was performed using SPSS 13.0 for Windows. Comparisons between two groups were performed by unpaired-test. Multiple comparisons between more than two groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA). Significance was considered to be $P < 0.05$. Experiments were performed at least three times.

Results

Silencing GLS or overexpressing GLS2 induces growth inhibition in different glioma cell lines and inhibition is synergistically augmented after oxidative stress

Cell proliferation (MTS) assays were performed to characterize growth of control and glutaminase-modified glioma cell lines (Fig. 2). In all inhibitory studies, non-transfected controls are equivalent to transfected controls. To avoid repetition,

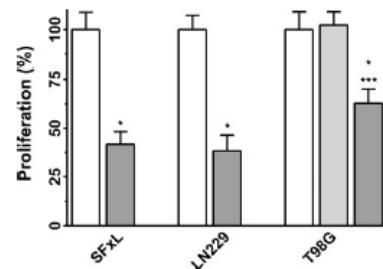


Fig. 2 Effect of GLS silencing or GLS2 overexpression on the proliferation of glioma cells after 24 h without treatment. Proliferation of SFxL-GLS(−) and LN229-GLS(−) versus SFxL and LN229 cells, and T98G-GAB versus T98G cells, respectively, were assayed by MTS method. White bars for SFxL and LN229 cells represent cells transfected with a non-silencing shRNA. For T98G, white bar represent value for wild-type cells. Dark grey bars represent values for GLS-silenced cells, or cells overexpressing GLS2. Light gray bars represent values for transfected control (T98G-pcDNA cell line). Data are presented as the mean±S.E. of triplicate experiments. Value for each control cell type was set at 100 %. Differences were always significant ($n=3$, * $P < 0.01$) between SFxL-GLS(−), LN229-GLS(−) or T98G-GAB cells and their respective control cells. Transfected controls were equivalent to non-transfected cells for all type of cells. Three asterisks indicated significantly different values between T98G-GAB cells and T98G-pcDNA cells (** $P < 0.01$)

only non-silencing controls are shown for SFxL and LN229 cells. White bars for SFxL and LN229 cells represent cells transfected with a non-silencing shRNA (Fig. 2). A rapid (24 h) effect was found in proliferation ratio when *GLS* was silenced in SFxL (41 %) and LN229 cells (38 %). Minor, but significant ($P < 0.01$), effect was depicted in T98G cells (63 %) in cells overexpressing *GLS2* (Fig. 2). No significant differences were found at 48 or 72 h (results not shown). Then, we used these human glioma cancer cell lines to evaluate the effects of ATO and H₂O₂ in cell survival. To assess the effect of these agents, each viability value was standardized setting 100 % to the respective value without treatment. All tested cell lines showed dose- and time-dependent sensitivity to oxidative stress by both oxidative agents. Thus, these cell lines provide us an excellent system to evaluate how silencing of *GLS* or overexpression of *GLS2* alters survival of glioma cell lines when an oxidative stress occurs. First, MTS assays were carried out to study the responsiveness of SFxL versus SFxL-GLS(−) to ATO (Fig. 3a). *GLS*-silenced cells were more sensitive to this oxidative agent than control cells. For example, a significant ($P < 0.01$) synergistic inhibition was shown (50 %) after 24 h of 20 μM ATO incubation. When incubation time was 48 h, more than 20 % inhibition was found at 2.5 μM ATO, but the highest effect was depicted at 5, 10, and 20 μM (more than 50 % inhibition). Finally, after 72-h treatment, the effect was stronger, 35 % at 2.5 μM and 50 % at 5, 10, and 20 (Fig. 3a). Regarding H₂O₂ effect, in SFxL pair, after 1 h (at 50, 100, and 200 μM) and 6 h (at 50 and 100 μM) treatments, the highest differences were observed (Fig. 3b). Moreover, significant differences were found at 200 μM (6 h). In LN229 system, similar survival rates were found (Fig. 3c,d). After treatment for 72 h, more than 75 % inhibition was noticed at 10 and 20 μM ATO (Fig. 3c). Large differences ($P < 0.01$) were also obtained for H₂O₂ treatment (Fig. 3d). Specifically, inhibition was >25 % at 100 μM (6 h) and 200 μM (15 min), and >35 % at 200 μM (1 and 6 h). For 300 μM H₂O₂ 50, 60 and 80 % inhibition were found respectively (15 min, 1 and 6 h). When overexpression of *GLS2* was studied, opposite results were obtained at 48 h for lower (10 and 20 μM) and higher (50 μM) ATO (Fig. 3e). When ATO concentration was 50 μM T98G-GAB cells showed higher survival ratio for 48-h treatment but no differences were observed after 24 and 72 h. However, clear inhibition values were found at 50 μM (24 and 72 h) and even at lower concentrations (5 and 10 μM) for 48 h. For H₂O₂ treatment, a similar heterogeneous pattern of survival was obtained, including a clear higher survival rate at 100 μM (6 h) (Fig. 3f). However, significant lower values were obtained at 200 μM (15 min and 1 h) as well as at 300 μM (1 and 6 h). For T98G and T98G-pcDNA control cell lines significant differences were not found (results not shown) neither for ATO or H₂O₂ treatment.

GLS silencing synergizes with induction of intrinsic apoptosis but *GLS2* overexpression can reduce apoptosis after oxidative stress

When assaying SFxL and LN229 pairs, after treatment for 48 h with 5 μM of ATO, the percentage of early apoptotic cells was 69 and 70 %, respectively (both $P < 0.01$ versus control), compared to untreated control cells (23 and 28 %) (Fig. 4a). Then, ATO clearly induced higher apoptotic activity in these glioma cells when *GLS* was silenced. Conversely, after treatment with 50 μM of ATO (48 h) T98G and T98G-GAB cells showed 60 and 30 % of apoptosis, respectively (Fig. 4a). Additional fluorimetric assays were then performed to verify whether *GLS*- and *GLS2*-mediated apoptosis was associated with caspase 3 activity and, consequently, through the intrinsic mechanisms. A large increase of caspase-3 activity was observed in both SFxL and LN229 pair cells after 48 h of exposure to 5 μM of ATO (Fig. 4b). Simultaneously, a clear decrease in caspase 3 activity was found in the pair of T98G and T98G-GAB cells when exposed to 50 μM of ATO (48 h).

GLS silencing and *GLS2* overexpression synergize with oxidative stress evoking formation of dysfunctional mitochondria

To prove whether the reduction of viability produced by ATO and H₂O₂ was the result of accumulation of dysfunctional mitochondria, the ΔΨm dissipation as a consequence of a 48 h-long treatment with ATO, or a 1 h-short treatment with H₂O₂, was analyzed in detail. As expected, control tumor cells showed a high mean red fluorescence (set to 100 %) after staining with JC-1 (Fig. 5). Cells silencing *GLS* or overexpressing *GLS2* show levels of fluorescence 10–20 % lower than controls. After treatment with oxidant agents (ATO and H₂O₂), the mean red fluorescence of the mitochondria dropped (40–55 %) in cells with knocked-down expression of *GLS*, indicating that the ΔΨm had collapsed, and that *GLS* silencing and ROS have a synergistic effect against functional mitochondria. As shown in Fig. 5 *GLS* silencing was able to produce sustained ΔΨm dissipation that was highly increased after a ROS insult ($P < 0.01$). SFxL and SFxL-GLS(−) cells, with or without treatment of 2.5 μM ATO (48 h), showed a significant reduction ($P < 0.01$) in the mean red fluorescence intensity (Fig. 5a), which, in repeated experiments, was similar to that seen for LN229 and LN229-GLS(−) cells (Fig. 5a). When experiments were carried out using the T98G glioma model, including cells overexpressing *GLS2*, similar results were found for 5 μM ATO (48 h) (Fig. 5a). On the other hand, treatment of glioma cells with cytotoxic doses of H₂O₂ (200 μM) causes a more rapid (1 h) loss of ΔΨm (Fig. 5b). Also in this case, such effect was shown for SFxL and LN229 models. Equally, significant lower ΔΨm were found for the T98G glioma model that overexpresses *GLS2* after 200 μM H₂O₂ (1 h) treatment (Fig. 5b).

Antioxidant glutathione levels were decreased in *GLS*-silenced glioma cells but augmented in glioma cells overexpressing *GLS2*. Both effects were augmented after an oxidative insult

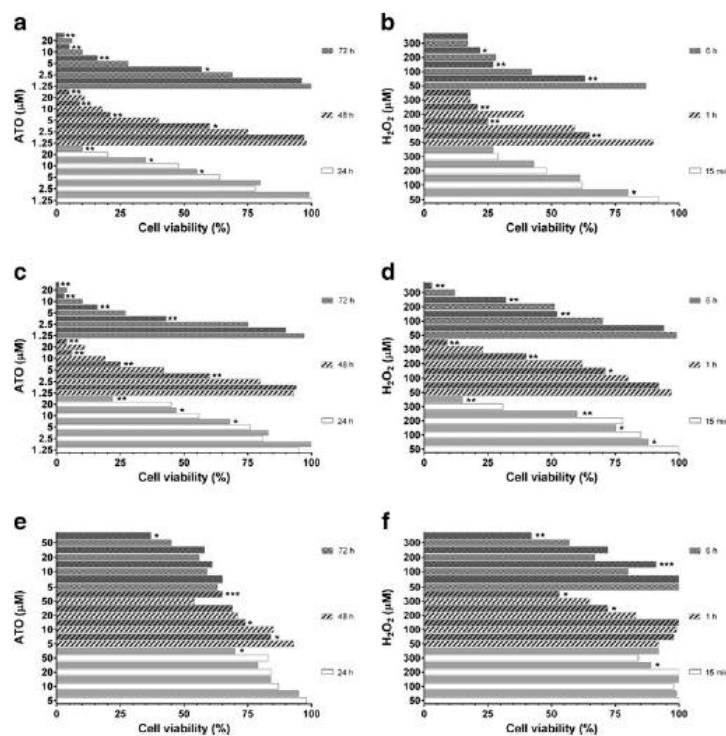


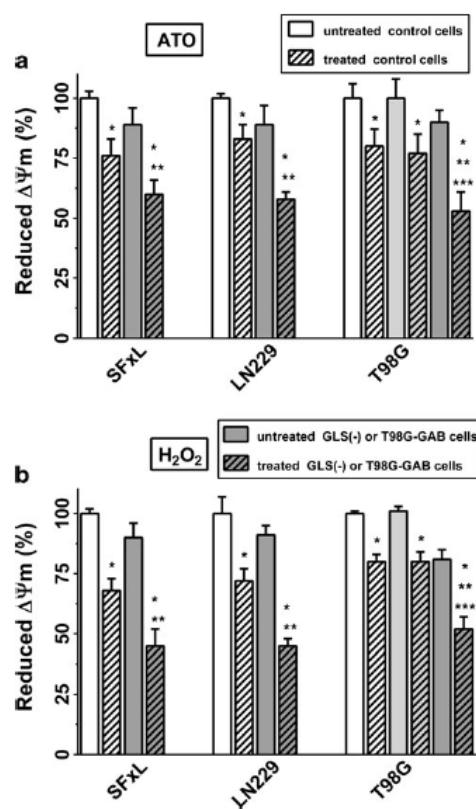
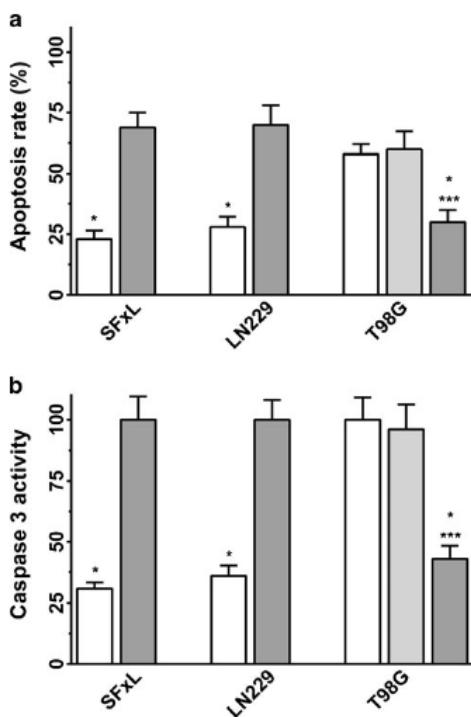
Fig. 3 Dose-dependent decrease in cell viability of the assayed glioma cell lines by MTS method after treatment with ATO or H₂O₂. **a** Bar chart showing percentages of survival in SFxL (white bars) and SFxL-GLS(-) (gray bars) cells when treated with 1.25–20 μM ATO for 24, 48, and 72 h. **b** Bar chart showing percentages of survival in SFxL (white bars) and SFxL-GLS(-) (gray bars) cells when treated with 50–300 μM H₂O₂ for 15 min, 1 h, and 6 h. **c** Bar chart showing percentages of survival in LN229 (white bars) and LN229-GLS(-) (gray bars) cells when treated with 1.25–20 μM ATO for 24, 48, and 72 h. **d** Bar chart showing percentages of survival in LN229 (white bars) and LN229-GLS(-) (gray bars) cells when treated with 50–300 μM H₂O₂ for 15 min, 1 h, and 6 h. **e** Bar chart showing percentages of survival in T98G (white bars) and

T98G-GAB (gray bars) cells when treated with 10–50 μM ATO for 24, 48, and 72 h. **f** Bar chart showing percentages of survival in T98G (white bars) and T98G-GAB (gray bars) cells when treated with 50–300 μM H₂O₂ for 15 min, 1 h, and 6 h. Each value is mean from three independent experiments. Error bars are not shown in this figure for clarity. Transfected controls were equivalent to non-transfected cells for all type of cells. Asterisks indicated significantly decreased values between SFxL-GLS(-), LN229-GLS(-), or T98G-GAB cells and their respective control cells (*P<0.05, **P<0.01). Three asterisks indicated significantly increased values between T98G-GAB cells and their respective control cells (**P<0.05)

Levels of GSH, the major cellular antioxidant, were affected by both *GLS* silencing and *GLS2* overexpression (Fig. 6a). However, the GSH/GSSG ratio was not significantly modified in any assayed cell type (Fig. 6b). Nevertheless, when cells were treated with 2.5 μM ATO (24 h) or 200 μM H₂O₂ (1 h), differences were much larger between control cells and their counterparts (Fig. 6c,e). Curiously, after treatment with oxidative agents, a clear difference appeared in GSH/GSSG ratio ($P<0.01$); specifically lower GSH/GSSG ratios for SFxL-GLS(-) and LN229-GLS(-), and higher GSH/GSSG ratios for T98G-GAB cells (Fig. 6d, f).

Inhibition of cell migration by *GLS* silencing or by *GLS2* overexpression, and synergistic effect after a ROS insult

For ATO treatment, the number of cells migrating across the upper well was decreased by 25 % and 20 % ($P<0.05$), respectively, when *GLS* was silenced in SFxL and LN229 cells, after oxidative insult for 24 h (Fig. 7a). Treatment was also assayed after 48 h and similar results were found. The rate of migrated cells was equally lower in T98G-GAB cells than the control cells. In fact, we observed that the migration rate of T98G-GAB cells decreased approximately 30 % ($P<0.05$) compared to both transfected and non-transfected control cells (Fig. 7a). Treatment was also assayed after 48 h showing



significant differences that were somewhat reduced in scope (Fig. 7a). When oxidative stress was induced with 1 μ M of H_2O_2 (24 h), the number of SFxL and LN229 cells migrating across the upper well also decreased significantly (20 and 22 % respectively) when compared with the respective non-silencing control cells ($P<0.05$) (Fig. 7b). The same experiment was performed with 2 μ M of H_2O_2 (24 h) for T98G-GAB cells and they showed a similar 30 % decrease ($P<0.05$), compared to both transfected and non-transfected

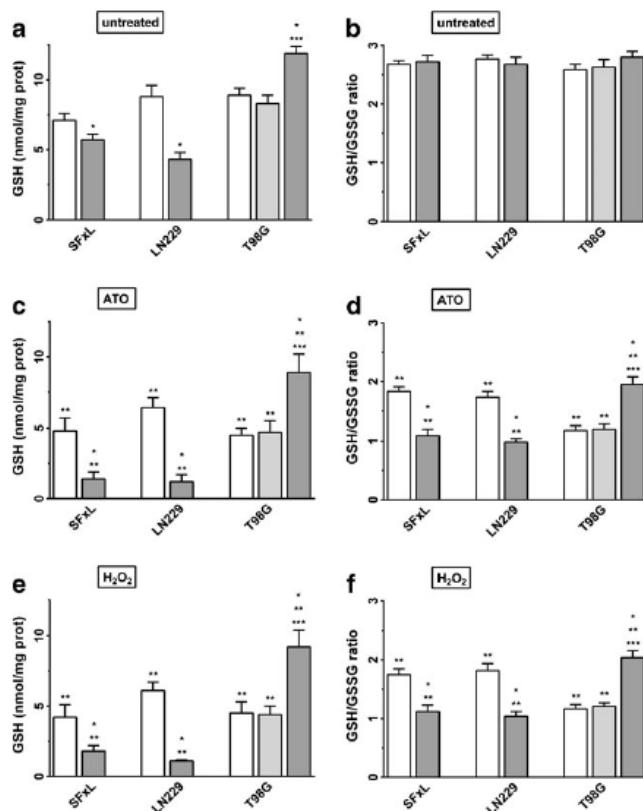


Fig. 6 Glutathione levels (nmol/mg protein) were measured in pooled control or *GLS*-silenced/*GLS2*-transfected cells. Color code for bars as depicted in Fig. 2. **a** GSH levels in SFxL-GLS(−), LN229-GLS(−), and T98G-GAB cells versus SFxL, LN229, and T98G/T98G-pcDNA cells, respectively. **b** GSH/GSSG ratios in SFxL-GLS(−), LN229-GLS(−), and T98G-GAB cells versus SFxL, LN229, and T98G/T98G-pcDNA cells, respectively. **c** GSH levels in SFxL-GLS(−), LN229-GLS(−), and T98G-GAB cells versus SFxL, LN229, and T98G/T98G-pcDNA cells, respectively, after 24-h ATO treatment (2.5 μM for SFxL and LN229 pairs, and 5 μM for T98G derivative cells). **d** GSH/GSSG ratios in SFxL-GLS(−), LN229-GLS(−) and T98G-GAB cells versus SFxL, LN229, and T98G/T98G-pcDNA cells, respectively, after 24-h ATO treatment (2.5 μM for SFxL and LN229 pairs, and 5 μM for T98G derivative cells). **e** GSH levels in SFxL-GLS(−), LN229-GLS(−), and T98G-GAB cells versus SFxL, LN229, and T98G/T98G-pcDNA cells, respectively, after 1-h treatment with H₂O₂ (200 μM for SFxL and LN229 pairs, and 300 μM for T98G derivative cells). **f** GSH/GSSG ratios in SFxL-GLS(−), LN229-GLS(−), and T98G-GAB cells versus SFxL, LN229, and T98G/T98G-pcDNA cells, respectively, after 1-h treatment with H₂O₂ (200 μM for SFxL and LN229 pairs, and 300 μM for T98G derivative cells). Differences were always significant ($n=3$, $*P<0.01$) between SFxL-GLS(−), LN229-GLS(−), or T98G-GAB cells and their respective control cells. Transfected controls were equivalent to non-transfected cells for all type of cells. Two asterisks (** $P<0.01$) indicated significantly different values between treated silenced/overexpressed cells and untreated control cells (panels **c** and **e** versus **a**, and panels **d** and **f** versus **b**). Three asterisks indicated significantly different values between treated T98G-GAB cells and treated T98G-pcDNA cells (** $P<0.01$)

control cells (Fig. 7b). Representative images of migrated cells are shown for non-silencing control and silenced SFxL, LN229 pair cells, as well as for non-transfected control T98G and T98G-GAB cells, after ATO (Fig. 8a) and H₂O₂ treatment (Fig. 8b), respectively. A representative synergistic effect between *GLS* inhibition and ATO treatment (5 μM, 48 h) is shown for LN229 pair of cells (Fig. 9a). As higher rates of migration inhibition were obtained after ATO treatment (Fig. 9b), panels for non-treated cells were omitted.

GLS silencing or *GLS2* overexpression reduced the expression of c-myc, as well as changed the expression of bid and bcl-2

To verify the role of *GLS* silencing in the expression of the oncoprotein c-myc, as well as pro-apoptotic bid and anti-apoptotic bcl-2 proteins, Western blot analysis of these key proteins was performed with lysates of SFxL, SFxL-GLS(−), LN229, and LN229-GLS(−) glioma cells after 48-h treatment with 2.5 μM ATO. Indeed c-myc, bid, and bcl-2 were present

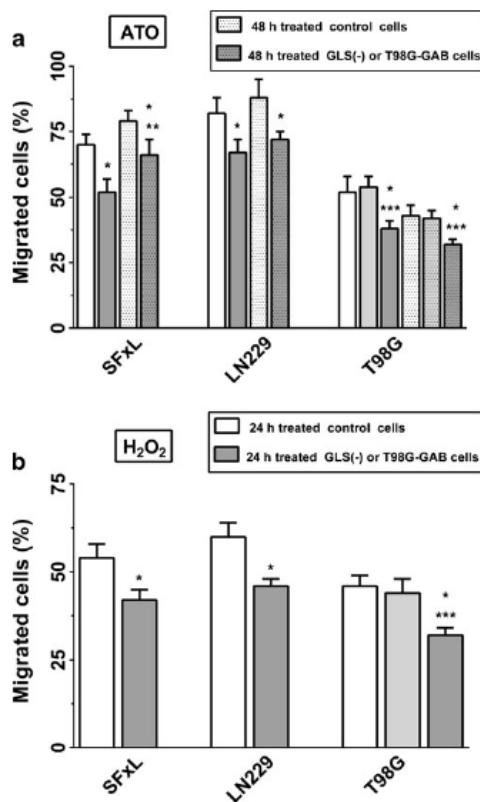


Fig. 7 *GLS* silencing and *GLS2* overexpression reduces glioma cells migration after an oxidative insult. Color code for bars as depicted in Fig. 2. Unfilled pattern means 24-h treatment. Dotted pattern means 48-h treatment. **a** Cell migration of SFxL-GLS(-) cells versus SFxL, LN229-GLS(-) cells versus LN229, and T98G-GAB cells versus T98G/T98G-pcDNA after ATO treatment. **b** Cell migration of SFxL-GLS(-) cells versus SFxL, LN229-GLS(-) cells versus LN229, and T98G-GAB cells versus T98G/T98G-pcDNA after H₂O₂ treatment. Data are the mean of three independent experiments. Transfected controls were equivalent to non-transfected cells for all type of cells. Asterisk indicated significantly different values between treated silenced/overexpressed cells and treated control cells (*P<0.01). Two asterisks indicated significantly different values between 24-h treated silenced/overexpressed cells and 48-h treated control cells (**P<0.01). Three asterisks indicated significantly different values between treated T98G-GAB cells and treated T98G-pcDNA cells (***P<0.01)

in all samples, although at different levels (Fig. 10a). Our find that protein levels vary between control and their corresponding *GLS*-silenced cell line is in agreement with our earlier findings where *GLS*-silenced cells showed a less tumorigenic phenotype. Note that levels of c-myc in *GLS*-silenced cells are much lower (ten times lower for SFxL and two times lower for LN229, based on densitometry than those for controls

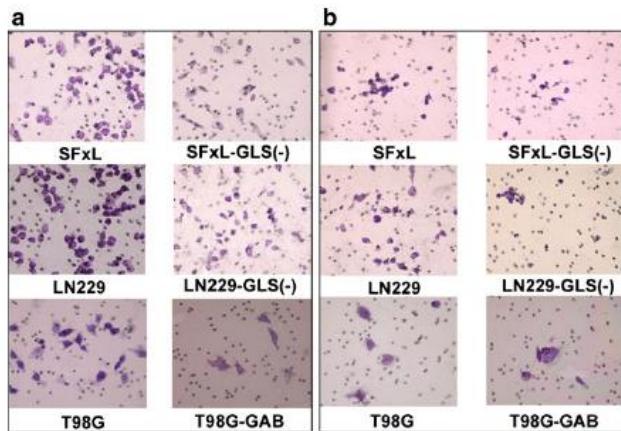
(Fig. 10b). These data suggest that c-myc plays a more important role in SFxL cells than in LN229 cells. Conversely, the abundance of bid band was augmented by twofold for both SFxL and LN229 cells, in comparison to *GLS*-silenced cells, respectively (Fig. 10b). This finding is consistent with an essential role of *GLS* in the effect of this pro-apoptotic factor in those cells. Additional support to the hypothesis that apoptosis is a pivotal process related to *GLS* expression came from bcl-2 protein expression levels: anti-apoptotic bcl-2 was less than 2.5- and 6-fold, respectively, expressed in both SFxL and LN229 cells, versus to their corresponding *GLS*-silenced cells (Fig. 10b). *GLS2* is a key isoenzyme linked to pro-apoptotic and tumor suppressor properties [7, 8, 15]. Consistently, when *GLS2* was overexpressed in T98G cells, c-myc and bcl-2 were less than 4- and 6-fold respectively expressed. In contrast, pro-apoptotic bid was 2.3-fold overexpressed (Fig. 11).

Discussion

Expression of glutaminase isoenzymes is a key switch in oncogenic signaling pathways

Glutaminase expression has been shown to be increased in several tumor types, such as lymphoma, prostate, brain (glioblastoma), and kidney cancers [9, 18]. Elevated glutaminase activity is under regulatory control of the oncogenic transcription factor c-myc, which itself is amplified in many cancers [5, 9, 20]. Glutaminase is also upregulated by other oncogenic signaling pathways [27], and by the small GTPase Rho in a NF-κB-dependent manner [6]. Defective signaling through tightly regulated apoptotic pathways that involve oxidative stress can contribute to both unbalance in apoptosis [25] and development of cancer [23]. Glutamine (via glutamate) is one of the precursor amino acid for glutathione, which is present within the cell as GSH and GSSG forms [8]. The ratio of GSH/GSSG is the most important regulator of the cellular redox potential [25]. Total GSH is used by cells for many purposes, but the GSH/GSSG ratio may indicate that the cells can utilize both GSH and GSSG, and both forms of glutathione could be used to bind free sulphydryl groups of cysteine residues in proteins [8]. In our experiments, T98G cells transfected with *GLS2* showed augmentation of both GSH and GSSG, while SFxL and LN229 cells which are deplete of GLS exhibited lower levels of both GSH and GSSG, consistent with *GLS2*'s prominent role in controlling overall redox status [8, 15]. In addition, silencing of *GLS* kills cells that overexpress c-myc and catabolize glutamine [20]. On the other hand, while lacking *GLS* expression, breast cell lines have shown a higher level of *GLS2* [17], according with the higher p53 levels given the ability of p53 to regulate *GLS2* [7, 15]. Nonetheless, an isoenzymatic balance exists between

Fig. 8 Photomicrographs of crystal violet-stained cells are shown for treated SFxL, LN229, and T98G derivative cells. The number of transmigrated glioma cells was counted at $\times 200$ magnification in ten microscopic fields randomly selected and calculated as mean cell number per field. Transfected controls did not show differences with non-transfected cells. Because space reasons only one type of control cells is shown for each assayed glioma. **a** Representative photomicrographs are shown after ATO treatment (24 h). **b** Representative photomicrographs are shown after H_2O_2 treatment (24 h)



GLS and GLS2 in most human cancers [8], and simultaneous control of the expression of both isoenzymes might be used as a valuable tool for some types of cancer.

Lower c-myc and bcl-2 expression, as well as higher pro-apoptotic bid expression were found as potential mediators of glioma cell apoptosis resulting from the combination of *GLS*-silencing and ATO treatment. To highlight, GA isoenzymes can regulate ROS generation [7], generate pro-apoptotic signals [8], and disturb reprogrammed metabolism (glutaminolysis) [14]. One of the biochemical hallmarks of tumor cells involves the reprogramming of energy metabolism

from primarily oxidative phosphorylation (OXPHOS) towards an enhanced rate of anaerobic glycolysis, a phenomenon termed the Warburg effect [16]. Interestingly, inhibition of *GLS* also provoked a significant decrease in the ratio of O-glycosylated to total proteins [28]. Accordingly, posttranslational modification of proteins by O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAcylation) is a key metabolic regulator of glucose metabolism in cancer cells. In fact, blocking glycosylation of phosphofructokinase 1 (PFK1) reduced cancer cell proliferation in vitro and impaired tumor formation in vivo [29].

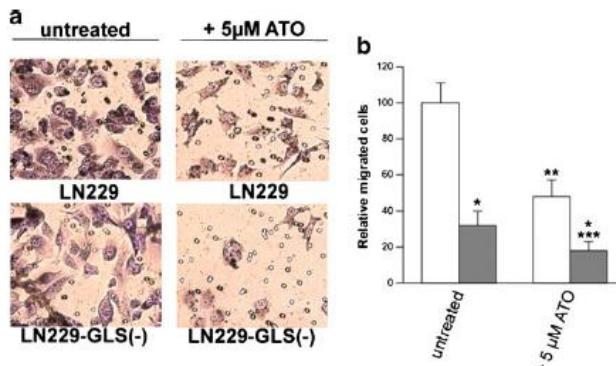


Fig. 9 Photomicrographs of crystal violet-stained cells are shown for untreated and ATO-treated LN229 and LN229-GLS(-) cells. After culture for 12 h, more untreated cells migrated to the centre of the wound field, whereas less ATO-treated cells and even fewer ATO-treated plus *GLS*-silencing cells did so. The number of transmigrated glioma cells was counted at $\times 200$ magnification in ten microscopic fields randomly selected and calculated as mean cell number per field. **a** Representative photomicrograph of LN229 and LN229-GLS(-) cells is shown with or without 5 μ M ATO treatment (48 h). **b** Relative number of migrated cells

are represented (value for untreated LN229 cells was set at 100%). White bars represent cells transfected with a non-silencing shRNA. Grey bars represent values for *GLS*-silenced cells. Asterisk indicated significantly different values between *GLS* silenced LN229 and non-silencing control for untreated or treated cells ($*P < 0.01$). Two asterisks indicated significantly different values between untreated and treated non-silencing cells ($**P < 0.01$). Three asterisks indicated significantly different values between untreated and treated *GLS* silenced LN229 cells ($***P < 0.05$)

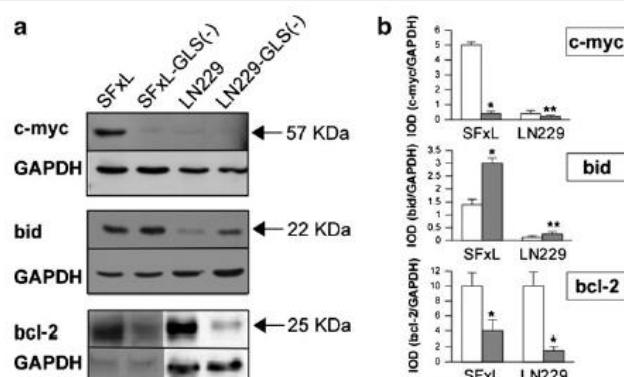


Fig. 10 Results of expression of c-myc, bid and bcl-2 proteins in SFxL and LN229 cells silenced cells. **a** Western blot analysis of glioma cell shows significant differences in the expression of some key proteins when simultaneously GLS was silenced and cells were treated during 48 h with 2.5 μM ATO. GAPDH was used as loading control. Data are from one of three representative experiments. **b** Relative levels of proteins as assessed by grey values. White bars represent cells transfected with a non-

silencing shRNA. Grey bars represent values for GLS-silenced cells. Quantifications were normalized to value obtained for GAPDH protein expression and represented as integrated optical density (IOD). Asterisk indicated significantly different values between GLS silenced SFxL or GLS silenced LN229 cells and their respective non-silencing control cells (* $P < 0.01$). Two asterisks indicated significantly different values between GLS silenced LN229 cells and non-silencing control cells (** $P < 0.05$)

A synergistic effect by GLS silencing or GLS2 overexpression plus an oxidative insult decreased apoptosis, antioxidant status and cellular motility

In this study, silencing GLS or overexpressing GLS2 genes decreased glioma cell survival. This effect was increased by an oxidative insult. Overall, the survival experiments firstly

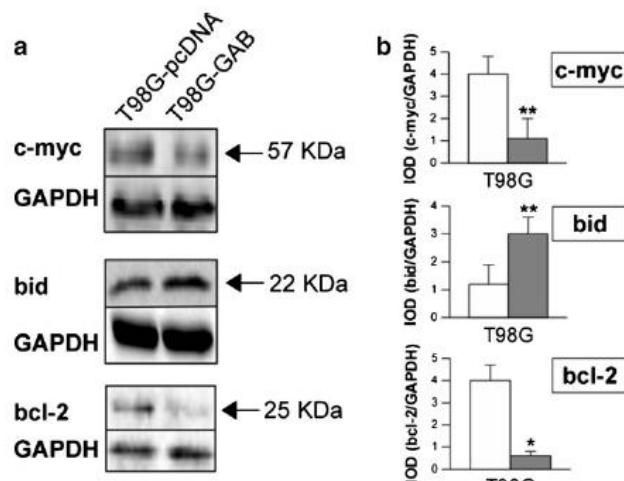


Fig. 11 Results of expression of c-myc, bid and bcl-2 proteins in T98G cells overexpressing GAB versus cells transfected with the empty vector. **a** Western blot analysis of glioma cell shows significant differences in the expression of some apoptotic key proteins when GAB was overexpressed. Non-transfected controls were equivalent to transfected controls. To avoid repetition, only transfected controls are shown. GAPDH was used as loading control. Data are from one of three

representative experiments. **b** Relative levels of proteins as assessed by grey values. White bars represent value for T98G-pcDNA (transfected control). Grey bars represent values for cells overexpressing GAB isoform. Quantifications were normalized to value obtained for GAPDH protein expression and represented as integrated optical density (IOD). Asterisks indicated significantly different values between T98G-GAB cells and transfected control T98G-pcDNA cells (* $P < 0.01$; ** $P < 0.05$)

suggest that longer periods of oxidative stress were required to achieve similar antiproliferative effects with ATO versus H₂O₂. Secondly, *GLS* silencing had a stronger synergistic inhibitory effect in cell survival than *GLS2* overexpression. Third, only higher concentrations and longer periods of both ATO and H₂O₂ evoke decreased cell viability in the T98G pair. A kind of balance exists and, in some other conditions, an opposite effect was observed. To test whether the decrease in SFxL and LN229 cell number observed after oxidative treatment was the result of apoptosis, ATO-treated cells were assayed for annexin V/PI staining and caspase 3 activity. We also tested apoptosis and caspase 3 activity for critical conditions that evokes higher survival ratios for T98G-GAB cells. Altogether, these results suggest that both the antiproliferative effect of *GLS* silencing and the higher survival in *GLS2* overexpressing cells may be caused by opposite ratios of intrinsic apoptosis. Additionally, after *GLS2* overexpression T98G glioma cells became more resistant to oxidative stress, reinforcing the idea of *GLS2* having a key role in GSH antioxidant function [7, 8, 15]. Both *GLS* silencing and *GLS2* overexpression showed diminished $\Delta\Psi_m$ and cell viability, but the decrease was substantially augmented after inducing oxidative stress with either agent, ATO or H₂O₂. Apoptosis and mitochondrial swelling is often associated with the loss of $\Delta\Psi_m$ [25]. In our research, these results mirror the data obtained for annexin V positive cells, as well as for caspase 3 activity, indicating that loss of $\Delta\Psi_m$ is linked to *GLS* and ROS-mediated cell killing. Loss of $\Delta\Psi_m$ is an early event of the apoptosis processes, which could be regulated by other pro-survival effectors, including higher glutathione levels [8]. Significantly, after oxidative treatments, *GLS* silencing disturbs redox balance severely disrupting ROS scavenging by GSH, as evidenced by a prominent lower GSH/GSG ratio in *GLS* silenced glioma cells. On the contrary, T98G-GAB cells showed the highest GSH/GSSG ratio after both ATO and H₂O₂ treatment. Evidently, this increased GSH/GSSG appeared insufficient to effectively counteract the pro-apoptotic pathway. These striking results obtained for GSH/GSSG ratios could be explained by the key role of GLS isoenzymes regulating oxidative stress [7, 15].

In addition, the lack of sensitivity of non-cancerous cell lines to the clinically relevant concentrations of ATO also suggests that this treatment is an adequate strategy to study the effect of *GLS* inhibition and/or *GLS2* overexpression on both oxidative stress and cancer growth. Certainly, non-transformed cells are less sensitive to oxidative injury [25], and tumor cells tend to display higher dependence on glutamine than non-malignant cells [5]. Moreover, H₂O₂ sensitivity of tumor cells can be modified by GSH-dependent mechanisms [25]. On the other hand, invasive ability and aberrant motility are key hallmarks of cancer [8]. To address whether *GLS* inhibition or *GLS2* overexpression plays a role in regulating the migration of SFxL, LN229, and T98G cells, we

investigated the influence of an oxidative insult on cells migration by a transwell assay, using controls and *GLS/GLS2* modified cells. The results point out an important relation between GA isoenzymes expression and migration rate of these glioma cell lines after both ATO and H₂O₂ treatment, and suggest that the decrease in migration rate might be synergistically related to the downregulation of *GLS* expression and/or overexpression of *GLS2*.

Future prospect of combination therapy as an effective strategy to combat glioma

Recently, selective pharmacological inhibition of bcl-2 has shown antitumor activity inducing apoptosis in bcl-2-dependent hematological cancers [30]. Efforts against glioma malignancies have focused on therapies which target key intracellular apoptotic pathways which may confer tumor resistance, such as p53 family, and more recently miRNAs [31]. This research by Liu et al. proposes a combination therapy which incorporates chemotherapy, radiotherapy, and selective apoptotic inhibitors and miRNA-based therapy, which is likely to be the future direction for the treatment of glioblastoma. Otherwise, caspase 3 and bcl-2 family proteins have been also involved in therapies targeting apoptosis signaling pathways in T98G cells [31]. In a very recent research, the expression of KGA and GAC isoforms was knocked down in T98G and T98G-GAB; the *GLS* silencing reduced proliferation and viability of glioblastoma cells and strengthen the antiproliferative effect evoked by *GLS2* overexpression. Therefore, combination of negative modulation of GA isoforms arising from *GLS* gene with the introduction of *GLS2* gene product, GAB, may in the future provide a useful means to curb glioblastoma growth *in situ* [32].

As previously proposed, GA modification will not be effective as a single-arm therapy but will be a part of a more complex strategy that may involve other metabolic targets, including inhibition of glycolysis [18]. Combination and sequential treatments to improve therapeutic efficacy are recommended [33], including synergistic antitumor effects of several natural antioxidants with current anticancer drugs [34]. In other study, an allosteric inhibitor of glutamine metabolism, the small molecule bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES) has been found to slow growth of glioblastoma cells targeting *GLS* but not *GLS2* isoenzymes [18]. The small molecule 968, a dibenzophenanthridine, was recently shown to inhibit GAC, blocking the proliferation and inhibiting tumor formation in mouse xenograft models. Of outstanding interest, an additive effect was observed when cancer cells are dosed with 968 and BPTES simultaneously [35]. As a main conclusion of our research, *GLS* silencing and overexpression of *GLS2* while simultaneously disrupting glutathione-dependent antioxidant capacity can synergistically contribute to an important effect

against tumor cell growth caused by ROS (ATO or H₂O₂ insult). Consistently, blocking *GLS* and/or overexpressing *GLS2* could help to reset cellular metabolism toward normal cell growth, providing a new strategy to combat some types of cancer, as those having mutant isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) cancer cells [18]. In another investigation, stable transfection with *GLS2* inhibited cell growth of T98G glioblastoma through downregulation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, and sensitized these cells to alkylating agents as temozolamide and carmustine. Consequently, enrichment with *GLS2*, in addition to inhibiting glioma growth, may facilitate chemotherapeutic intervention [36].

Reprogramming glutamine metabolism is a promising tool against cancer

Cancer often involves perturbations of normal signal transduction, including glutamine metabolism [2, 5, 13, 16]. Although metabolic profiles of tumors depend on both the genotype and tissue of origin [20], cancer cells have a very different metabolic profile compared to normal cells [21]. Of note, targeting metabolism of breast cancer cells with ATO has been a very useful strategy. Interestingly, lower sensitivity of normal cells to the concentrations of ATO tested in this study states that this agent as a promising treatment against solid tumors *in vivo* [24]. Given the importance of glutamine metabolism in maintaining the redox state in cancer [8] future therapeutic approaches could synergize with ATO or H₂O₂ treatment. In fact, when combined with H₂O₂, the growth-suppressive effect on pancreatic cancer cells was notably augmented, indicating that cancer cells are markedly more sensitive to ROS when glutamine metabolism is impaired and glutathione levels are reduced [37]. Hence, these authors revealed that inhibition of glutaminase in cancer cells can potentially synergize with therapies that increase intracellular ROS, for example chemotherapy and radiation [37].

Multiple nuclear proteins may regulate the transcription of the human *GLS2* gene promoter [38], suggesting its possible involvement in transcription regulation [3]. Interestingly, there is a growing body of evidence pointing to glutamine as a signaling molecule involved in gene expression [8]. The significance of the nuclear *GLS2* localization could be as simple as being an enzyme controlling *in situ* the glutamine levels in the nucleoplasm and therefore being indirectly involved in the expression of glutamine-regulated genes [3]. It is becoming clear that metabolic reprogramming network is induced by many proteins, such as IDH1, c-myc, p53, *GLS*, *GLS2*, and other molecules that act both independently and in concert with each other [39]. Therefore, RNAi-mediated downregulation of *GLS* and overexpression of *GLS2* could be valuable tools for defining gene expression and functional programs downstream of oncogenic *GLS* as well as tumor suppressor *GLS2* signals, which, in turn, may be helpful to isolate novel

diagnostic markers, and for designing tumor-specific intervention at downstream targets of *GLS* and *GLS2*.

Acknowledgements We apologize for omissions of original references because of space limitations. Thanks are due to Rosa M. Moreno and Juan I. Rodríguez-Aranz for their valuable help in experimental tasks. This work was supported by Ministerio de Educación of Spain, PIB2010-0014-PC; Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain, SAF2010-17573; Junta de Andalucía, CFI-6656, Spain; PI-0825-2010, Junta de Andalucía, Spain; grant RD06/1012 of the RTA RETICS network from the Spanish Health Institute Carlos III, Spain. R.J.D. is supported by grants from the NIH (R01 CA157996), the Cancer Prevention and Research Institute of Texas (HHPD 100437 and RP101243), the Robert A. Welch Foundation (I-1733), and the Damon Runyon Cancer Research Foundation. M.S. and J.A. received support from the Ministry of Science and Higher Education (National Science Centre), grant NN401 039238. Thanks are also due to CAPES/DGU 250/11, Brazil.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interests related to this study.

References

- Márquez J, de la Oliva AR, Matés JM, Segura JA, Alonso FJ (2006) Glutaminase: a multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochem Int* 48:465–471
- DeBerardino RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7:11–20
- Olalla L, Gutiérrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Márquez J, Alejo JC (2002) Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J Biol Chem* 277:38939–38944
- Márquez J, Tosina M, de la Rosa V, Segura JA, Alonso FJ, Matés JM, Campos-Sandoval JA (2009) New insights into brain glutaminases: beyond their role on glutamatergic transmission. *Neurochem Int* 55: 64–70
- Dang CV (2009) MYC, microRNAs and glutamine addiction in cancers. *Cell Cycle* 8:3243–3245
- Wang JB, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, Wilson KF, Ambrosio AL, Dias SM, Dang CV et al (2010) Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18:207–219
- Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y et al (2010) Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7461–7466
- Matés JM, Segura JA, Martín-Ruiz M, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Márquez J (2013) Glutaminase isoenzymes as key regulators in metabolic and oxidative stress against cancer. *Curr Mol Med* 13:514–534
- Gao P, Tchernyshov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eijk JE, Mendell JT et al (2009) c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458: 762–765
- Martín-Ruiz M, Tosina M, Campos-Sandoval JA, Manzanares E, Lobo C, Segura JA, Alonso FJ, Matés JM, Márquez J (2012) Mammalian glutaminase *Gl2* gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS One* 7:e38380

11. de la Rosa V, Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, Cardona C, Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J (2009) A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochem Int* 55:76–84
12. Szeliga M, Obara-Michlewski M, Matyja E, Lazarczyk M, Lobo C, Hilgier W, Alonso FJ, Marquez J, Albrecht J (2009) Transfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia* 57:1014–1023
13. Cheng T, Suderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Matés JM, DeBerardinis RJ (2011) Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:8674–8679
14. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB et al (2008) Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18782–18787
15. Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z (2010) Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7455–7460
16. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029–1033
17. Kung HN, Marks JR, Chi JT (2011) Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. *PLoS Genet* 7:e1002229
18. Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, Tsukamoto T, Rojas CJ, Slusher BS, Rabinowitz JD et al (2010) Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res* 70:8981–8987
19. Yunева M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y (2007) Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 178:93–105
20. Yuneva MO, Fan TW, Allen TD, Higashi RM, Ferraris DV, Tsukamoto T, Matés JM, Alonso FJ, Wang C, Seo Y et al (2012) The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab* 15:157–170
21. Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, Cho S, Baek H, Yang XL, Rajagopalan KN, Maddie M, Vemireddy V, Zhao Z et al (2012) Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain *in vivo*. *Cell Metab* 15:827–837. Erratum in: *Cell Metab* 16:686
22. Maher EA, Marin-Valencia I, Bachoo RM, Mashimo T, Raisanen J, Hattanpaa KJ, Jindal A, Jeffrey FM, Choi C, Madden C et al (2012) Metabolism of [¹⁴C]glucose in human brain tumors *in vivo*. *NMR Biomed* 25:1234–1244
23. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, Kalyanaraman B, Muthu GM, Budinger GR, Chandel NS (2010) Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8788–8793
24. Sun RC, Board PG, Blackburn AC (2011) Targeting metabolism with arsenic trioxide and dichloroacetate in breast cancer cells. *Mol Cancer* 10:142
25. Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J (2012) Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch Toxicol* 86:1649–1665
26. Rahman I, Kode A, Biswas SK (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 1:3159–3165
27. Thangavelu K, Pan CQ, Karlberg T, Balaji G, Uttamchandani M, Suresh V, Schüller H, Low BC, Sivaraman J (2012) Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:7705–7710
28. Donadio AC, Lobo C, Tosina M, de la Rosa V, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Matés JM, Márquez J, Alonso FJ, Segura JA (2008) Antisense glutaminase inhibition modifies the O-GlcNAc pattern and flux through the hexosamine pathway in breast cancer cells. *J Cell Biochem* 103:800–811
29. Yi W, Clark PM, Mason DE, Keenan MC, Hill C, Goddard WA 3rd, Peters EC, Driggers EM, Hsieh-Wilson LC (2012) Phosphofuctokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science* 337:975–980
30. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ et al (2013) ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 19:202–208
31. Liu J, Albrecht AM, Ni X, Yang J, Li M (2013) Glioblastoma tumor initiating cells: therapeutic strategies targeting apoptosis and MicroRNA pathways. *Curr Mol Med* 13:352–357
32. Szeliga M, Bogacińska-Kanś M, Różycka A, Hilgier W, Marquez J, Albrecht J (2013) Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioma cells. *Tumor Biol*. doi:10.1007/s13277-013-1247-4
33. Lee MJ, Ye AS, Gardino AK, Heijink AM, Songer PK, MacBeath G, Yaffe MB (2012) Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks. *Cell* 149:780–794
34. Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J (2011) Anticancer antioxidant regulatory functions of phytochemicals. *Curr Med Chem* 18:2315–2338
35. Kati WP, Ramachandran S, Erickson JW, Cerione RA (2012) Dibenzophenanthridines as inhibitors of glutaminase C and cancer cell proliferation. *Mol Cancer Ther* 11:1269–1278
36. Szeliga M, Zgrzywa A, Obara-Michlewski M, Albrecht J (2012) Transfection of a human glioblastoma cell line with liver-type glutaminase (LGA) down-regulates the expression of DNA-repair gene MGMT and sensitizes the cells to alkylating agents. *J Neurochem* 123:428–436
37. Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera RM, Ferone CR, Mullarky E, Shyh-Chang N et al (2013) Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* 496:101–105
38. Pérez-Gómez C, Matés JM, Gómez-Fabre PM, del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Márquez J (2003) Genomic organization and transcriptional analysis of the human L-glutaminase gene. *Biochem J* 370: 771–784
39. Soga T (2013) Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci* 104:275–281