

LAÍS MENDES DOS SANTOS GOES

ANÁLISE DO PAPEL DAS CICLO-OXIGENASES E PROSTAGLANDINA E
SINTASE-1 MICROSSOMAL NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE MATRIZ
EXTRACELULAR, INTEGRINAS E MIGRAÇÃO CELULAR EM GLIOBLASTOMA

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

São Paulo

2020

LAÍS MENDES DOS SANTOS GOES

ANÁLISE DO PAPEL DAS CICLO-OXIGENASES E PROSTAGLANDINA E
SINTASE-1 MICROSSOMAL NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE MATRIZ
EXTRACELULAR, INTEGRINAS E MIGRAÇÃO CELULAR EM GLIOBLASTOMA

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

Área de Concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alison Colquhoun

Versão original.

São Paulo

2020

RESUMO

GOES, L.M.S. Análise do papel das ciclo-oxigenases e prostaglandina E sintase-1 microsossomal na expressão de proteínas de matriz extracelular, integrinas e migração celular em glioblastoma. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2020.

O glioblastoma (GBM) é a neoplasia maligna mais frequente e letal do sistema nervoso central (SNC). Este tumor é caracterizado por uma elevada taxa proliferativa e rápida infiltração difusa no tecido cerebral adjacente. A terapia indicada para GBM consiste na ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia e quimioterapia. Apesar dos tratamentos disponíveis a sobrevida média dos pacientes é de aproximadamente 14 meses após o diagnóstico. Parte da dificuldade do tratamento deve-se à elevada taxa de migração e invasão das células de GBM. Componentes da matriz extracelular (MEC) e receptores do tipo integrina (ITG) desempenham papel crucial na disseminação de GBM. Os níveis das ciclo-oxigenases (COXs) e seu principal produto a prostaglandina E₂ (PGE₂) estão diretamente relacionados à migração e invasão tumoral, assim como, maior grau de agressividade e pior prognóstico. A prostaglandina E sintase-1 microsossomal (mPGES-1) é a principal sintase de PGE₂. Este estudo teve por objetivo avaliar o papel das COX-1 e COX-2, mPGES-1 e PGE₂ na migração celular e na expressão de ITGs e proteínas da MEC em linhagens de GBM humano (U87MG e T98G). Os resultados demonstraram que a inibição das COX-1 e 2, assim como, da mPGES-1 reduziu o número de células e a migração de celular de GBM *in vitro*. PGE₂ aumentou o número de células viáveis de ambas as linhagens e a migração das células T98G. Inibidores seletivos de COX-1, COX-2 e mPGES-1 promoveram alterações no citoesqueleto de actina e, conseqüentemente, redução da motilidade celular. A inibição de mPGES-1 diminuiu significativamente a expressão de proteínas da MEC nas duas linhagens estudadas. O tratamento com PGE₂ ou inibidores de COX-1 e/ou COX-2 influenciaram de maneira diversa a expressão de proteínas da MEC e ITGs nas linhagens estudadas. Em conjunto, esses dados demonstram que as COXs e mPGES-1 desempenham um papel no crescimento celular, reorganização do citoesqueleto, expressão de proteínas da MEC e ITGs, assim como, migração celular em linhagens de GBM.

Palavras-chave: Glioblastoma. Migração celular. Matriz Extracelular. Integrinas.

ABSTRACT

GOES, L.M.S. Analysis of the role of cyclooxygenases and microsomal prostaglandin E synthase-1 in the expression of extracellular matrix proteins, integrins and cell migration in glioblastoma. [Masters thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2020.

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and lethal malignant neoplasm of the central nervous system (CNS). This tumor is characterized by a high proliferative rate and rapid diffuse infiltration in the adjacent brain tissue. The therapy indicated for GBM consists of surgical resection, followed by radiotherapy and chemotherapy. Despite the treatments available, the median survival of patients is approximately 14 months after diagnosis. Part of the difficulty in treatment is due to the high rate of migration and invasion of GBM cells. Components of the extracellular matrix (MEC) and integrin-type receptors (ITG) play a crucial role in the spread of GBM. The levels of cyclooxygenases (COXs) and their main product, prostaglandin E₂ (PGE₂), are directly related to tumor migration and invasion, as well as a greater degree of aggressiveness and a worse prognosis. Microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) is the main synthase of PGE₂. This study aimed to evaluate the role of COX-1 and COX-2, mPGES-1 and PGE₂ in cell migration and in the expression of ITGs and MEC proteins in human GBM cell lines (U87MG and T98G). The results showed that inhibition of COX-1 and 2, as well as mPGES-1, reduced the number of cells and migration of GBM cells *in vitro*. PGE₂ increased the number of road cells of both strains and the migration of T98G cells. Selective COX-1, COX-2 and mPGES-1 inhibitors promoted changes in the actin cytoskeleton and, consequently, reduced cellular motility. The inhibition of mPGES-1 significantly decreased the expression of MEC proteins in the two cell lines studied. The treatment with PGE₂ or COX-1 and/or COX-2 inhibitors influenced in a different way the expression of MEC proteins and ITGs in the studied cells. Taken together, these data demonstrate that COXs and mPGES-1 play a role in cell growth, cytoskeletal reorganization, expression of MEC proteins and ITGs, as well as cell migration in GBM cells.

Keywords: Glioblastoma. Cell migration. Extracellular Matrix. Integrins

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas: classificação e caracterização

Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) são tumores benignos ou malignos que ocorrem nas seguintes localizações: meninges, cérebro, medula espinhal, nervos cranianos e outras partes do SNC, hipófise, ducto craniofaríngeo e glândula pineal (McCarthy *et al.*, 2005).

As neoplasias malignas do SNC foram responsáveis por 4,2% das mortes por câncer no Brasil em 2017. Excluindo-se o câncer de pele não melanoma, os tumores do SNC representam um dos 10 tipos de câncer mais incidentes no país para ambos os sexos (Figura 1). Para o ano de 2018, foram estimados 5,62 novos casos a cada 100 mil homens e 5,17 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2019).

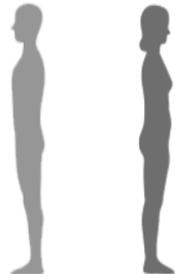
Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 no Brasil, segundo o INCA (exceto tumores de pele não melanoma).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os tumores de SNC de acordo com suas características histopatológicas, células de origem e grau de diferenciação em: tumores astrocíticos e oligodendroglias difusos; outros tumores astrocíticos; tumores ependimais; outros gliomas; tumores do plexo coroide; tumores neurais e neurogliais mistos; tumores da região pineal; tumores embrionários; tumores dos nervos craniais e paraespinhais; meningiomas; tumores mesenquimais não meningoteliais; tumores melanocíticos; linfomas; tumores histiocíticos; tumores de células germinativas; tumores da região selar e tumores metastáticos. Esses grupos de tumores podem ser subclassificados quanto ao grau de malignidade do grau I ao grau IV, e quanto à suas características moleculares (Louis *et. al.*, 2016; Louis *et al.*, 2007).

Os gliomas são os tumores do SNC mais comuns e representam cerca de 30% dos casos, e 80% de todos os tumores cerebrais malignos (YI *et al.*, 2016). Consistem em tumores originados das células da glia ou células precursoras menos diferenciadas, as quais são responsáveis pelo fornecimento de um microambiente adequado para a sobrevivência dos neurônios (Pencheva *et al.*, 2017). Os gliomas são classificados histologicamente de acordo com a célula de origem em astrocitomas (astrócitos), oligodendrogliomas (oligodendrócitos) e ependimomas (ependimócitos). Os astrocitomas são os mais frequentes e são classificados histopatologicamente quanto à malignidade do grau I ao IV, respectivamente em: astrocitomas pilocíticos, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e glioblastoma (GBM) (Wen, Huse, 2016).

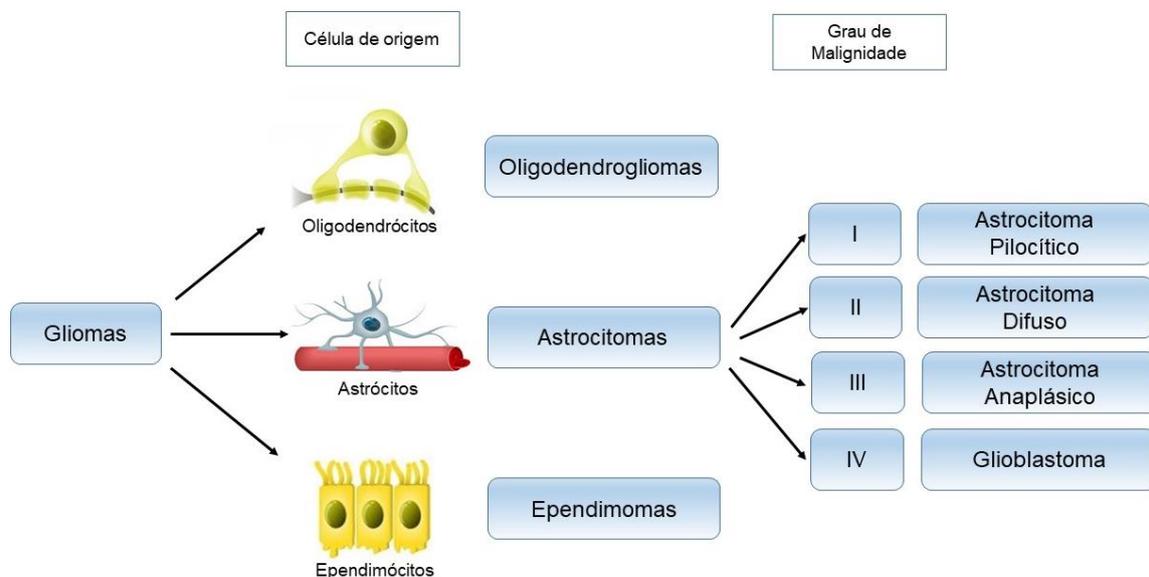


Figura 2. Classificação histopatológica dos gliomas.

Os astrocitomas pilocíticos são tumores de baixo grau de malignidade (grau I), que apresentam crescimento lento e geralmente não são infiltrativos. São os tumores cerebrais pediátricos mais comuns, com pico de incidência na primeira década de vida. Embora apresente grandes chances de cura após sua ressecção total, a recorrência do tumor é observada em aproximadamente 19% dos casos. A progressão para graus de malignidade mais elevados é extremamente rara (Jones *et al.*, 2008; Wen, Huse, 2016). Os astrocitomas pilocíticos são caracterizados molecularmente, segundo a OMS (2016), como tumores que não possuem alterações nos genes da família da isocitrato desidrogenase (IDH) e frequentemente possuem alterações do gene *BRAF* (Louis *et al.*, 2016).

Astrocitomas difusos são tumores de grau II que apresentam crescimento lento, atipia celular e capacidade infiltrativa. Se desenvolvem mais frequentemente em jovens adultos e possuem a tendência a progredir para tumores de maior grau de malignidade como o astrocitoma anaplásico (grau III) ou glioblastoma (grau IV). Geralmente esses tumores não apresentam deleção dos braços dos cromossomos 1p e 19q. Cerca de dois terços apresentam mutação de perda de função do gene *TP53*. A maioria dos casos de astrocitomas difusos possuem mutação em *IDH* o que caracteriza um melhor prognóstico (Watanabe *et al.*, 2002; Wen, Huse, 2016).

Os astrocitomas anaplásicos são tumores infiltrativos caracterizados por anaplasia celular e grande atividade mitótica. São tumores pouco frequentes cuja incidência é de cerca de 0,3 casos a cada 100 mil pessoas, sendo mais frequente em adultos acima dos 45 anos. Assim como os astrocitomas difusos (grau II), a maioria dos astrocitomas anaplásicos apresentam mutação em *IDH* e em *TP53*. Além disso, é comum a perda de heterozigose do cromossomo 19. O prognóstico é ruim uma vez que a ressecção total do tumor geralmente não é possível devido a sua infiltração difusa. Além disso, seu ressurgimento após o uso de todas as terapias disponíveis é frequente. Apenas 16% dos pacientes sobrevivem por até cinco anos (Louis *et al.*, 2007; Stupp *et al.*, 2007; Wen, Huse, 2016).

O glioblastoma (GBM) é o mais incidente, agressivo e infiltrativo dos astrocitomas, com taxa de incidência de aproximadamente 3,6 – 4,2 casos entre 100.000 pessoas, representando cerca de 81 % de todos os tumores malignos do SNC e 60% de todos os gliomas (Mehta *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017; Yi *et al.*, 2016). Suas principais características são: hipercelularidade, células pouco diferenciadas do tipo fusiforme ou pleomórfica, núcleos atípicos, grande atividade mitótica, focos de necrose, hiperplasia microvascular, altíssima invasibilidade nas estruturas cerebrais e uma baixa capacidade de realizar metástases fora do SNC (Roos *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012).

De acordo com sua origem, características clínicas e moleculares o GBM pode ser subclassificado em primário ou secundário. O GBM primário, ou *de novo*, geralmente se origina diretamente das células astrocíticas e na maioria das vezes é caracterizado molecularmente como sendo *TP53* e *IDH* tipo selvagem, além de apresentar mutação no gene *PTEN* (homólogo de fosfatase e tensina), amplificação e aumento da expressão do gene de receptores de fator de crescimento epidermal (*EGFR*) e perda do braço curto e/ou longo do cromossomo 10 (deleção 10p e/ou

10q). Trata-se do tipo mais agressivo e invasivo, apresentando um pior prognóstico e representa 90% dos casos de glioblastoma, ocorrendo principalmente em indivíduos com idade igual ou superior a 55 anos. O GBM secundário é originado dos astrocitomas de graus inferiores e possui maior incidência entre pacientes com idade aproximada de 45 anos, representando cerca de 5% dos casos de GBM. Geralmente, são molecularmente caracterizados por mutação em *IDH* e *TP53*, além de apresentarem perda de heterozigidade em 19q e 22q (Delgado-López e Corrales-García, 2016; Louis *et al.*, 2016; Ohgaki, Kleihues, 2013).

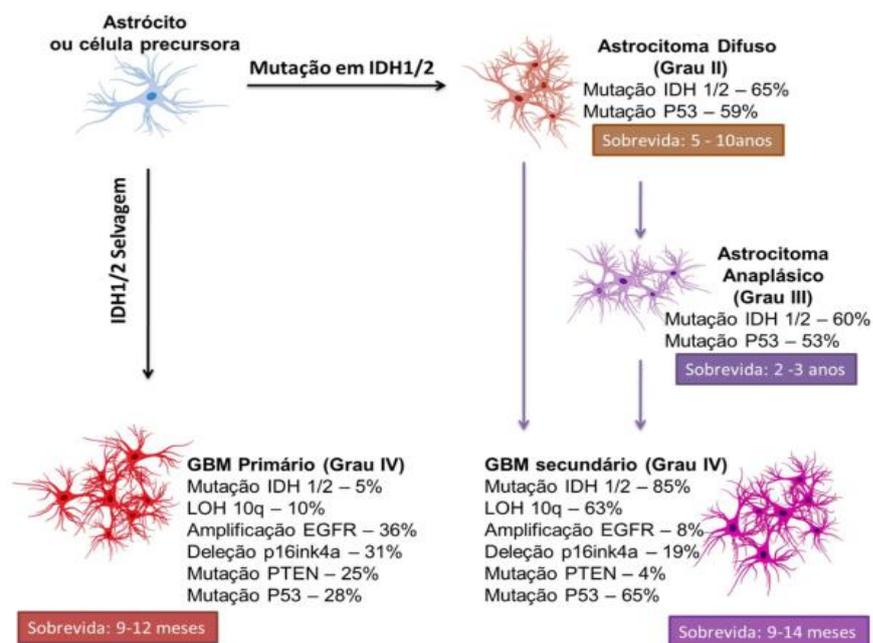


Figura 3. Alterações moleculares na progressão de glioblastoma pela via *de novo* (primária) e via progressiva (secundária), Souza, 2017.

Os principais tratamentos de glioblastoma consistem em retirada cirúrgica do tumor, seguida de radioterapia e quimioterapia. Embora a retirada completa do tumor através de intervenção cirúrgica seja o tratamento inicial mais indicado, a ampla infiltração de células tumorais no tecido cerebral saudável adjacente torna a ressecção total do tumor impossível, o que colabora para a recorrência tumoral poucos meses após a cirurgia. Além do mais, o glioblastoma é geralmente muito resistente à terapia convencional, muito provavelmente por apresentar elevado grau de heterogeneidade celular (Coniglio, Segall, 2013; Roos *et al.*, 2017; Yi *et al.*, 2016). A realização de radioterapia localizada é dificultada pela ampla difusão de células neoplásicas no tecido nervoso normal, sendo comum a ocorrência de vários focos do tumor no cérebro.

Os pacientes com glioblastoma tem uma sobrevida aproximada de 6 a 12 meses após a cirurgia, apenas cerca de 28% dos pacientes apresentam sobrevida aproximada de 2 anos após o diagnóstico e 5% vivem por 5 anos. Provavelmente devido ao curto período de sobrevida, seja difícil a verificação de metástase por glioblastoma em sítios extracranianos, sendo este fenômeno observado em cerca de 0,5% dos casos de GBM e geralmente observado em pacientes jovens ($38,2 \pm 16,1$ anos) e do sexo masculino (Cunha, Maldaun, 2019). Apesar dos avanços terapêuticos e do desenvolvimento de novos fármacos, ainda não existe cura para esse tipo de glioma, sendo o tratamento utilizado apenas para o aumento do tempo de sobrevida dos pacientes (Roos *et al.*, 2017; Taghipour *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2012).

1.2 Migração celular de gliomas

1.2.1 Principais vias de migração de gliomas

A migração celular desempenha um papel central em uma ampla variedade de processos biológicos como desenvolvimento embrionário, resposta imune inflamatória, reparo de feridas, desenvolvimento de tumores e formação de metástases. A migração celular é conduzida por uma organização bioquímica e biomecânica intracelular em resposta a sinais extracelulares (Horwitz, Parsons, 1999).

Após a exposição a um estímulo externo, o processo de migração celular se inicia com a reorganização do citoesqueleto de actina e desmontagem de adesões focais, o que leva a formação de protusões da membrana plasmática na porção frontal da célula, chamadas de lamelipódios. Posteriormente, ocorre a estabilização das protusões por meio da formação de complexos adesivos. Estes complexos adesivos são regiões da membrana plasmática onde receptores do tipo integrina, filamentos de actina e proteínas associadas se organizam formando adesões focais que servem de pontos de tração entre o corpo celular e a matriz extracelular (MEC). Ocorre então, a contração do corpo celular e liberação de adesões na porção traseira da célula promovendo o seu deslocamento (Horwitz, Parsons, 1999; Mak *et al.*, 2016; Raftopoulou, Hall, 2004).

Em câncer, a migração celular é um fenômeno crucial, visto que a capacidade das células de tumores malignos de migrar e invadir tecidos saudáveis em áreas próximas ou distantes do tumor consiste em uma das suas principais características (Hanahan, Weinberg, 2011). Diferente de diversos outros tipos de tumores sólidos, os gliomas dificilmente realizam metástases intravasculares ou linfáticas, em vez disso, as células de glioma migram ativamente através dos espaços extracelulares do cérebro, o que leva à formação de tumores satélites distantes (Cuddapah *et al.*, 2014). Análise histológica de amostras de pacientes mostrou uma zona de infiltração difusa de 2 a 3 cm ao redor do tumor, embora outros estudos demonstraram que células de gliomas malignos podem se infiltrar no tecido cerebral sadio a uma distância superior a 4 cm da massa tumoral (Goldbrunner *et al.*, 1998).

A migração celular de gliomas pode ocorrer pelo parênquima cerebral (substância cinza e substância branca) ou por estruturas anatômicas distintas como feixes de fibras mielinizadas, espaço perivascular, espaço subaracnoide e glia limitante externa (Giese, Westphal, 1996; Cuddapah *et al.*, 2014). O comportamento migratório e invasivo das células de gliomas é, em parte, uma consequência da reação destas células a componentes da MEC. Desse modo, dentre os fatores microambientais que influenciam a motilidade celular em tumores pode-se destacar as proteínas da MEC (Goldbrunner *et al.*, 1988; Guillamo *et al.*, 2001).

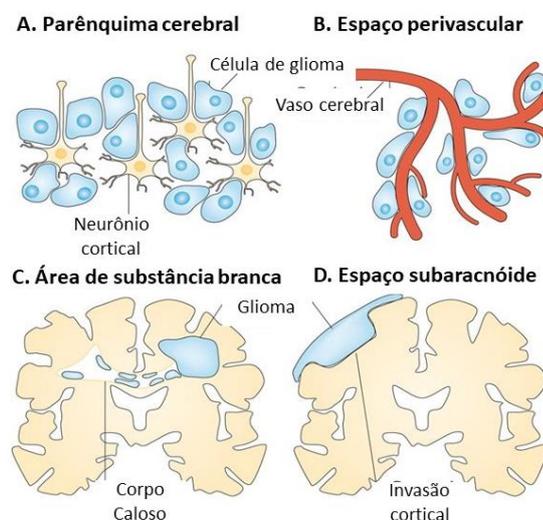


Figura 4. Representação das principais vias de migração dos gliomas. Adaptado de Cuddapah *et al.*, 2014.

Cada uma das principais vias de migração dos gliomas apresenta composição de MEC bastante distinta: a) o parênquima cerebral, principalmente a

área de substância cinzenta, contém ácido hialurônico, proteoglicanos de sulfato de condroitina, agrecan, brevican, proteína de ligação ao hialuronato glial e tenascina R; b) a membrana basal dos vasos sanguíneos (espaço perivascular) contém laminina, fibronectina, colágeno tipos IV e V, vitronectina, entactina e heparan sulfato; c) a área ao redor dos feixes de fibras mielinizadas possui basicamente os mesmos componentes presentes na substância cinzenta e glicoproteínas associadas a mielina (MAG); d) a glia limitante externa possui colágenos tipo I, III e IV, fibronectina, laminina e heparan sulfato (Giese, Westphal, 1996; Guillamo *et al.*, 2001).

Dentre as estruturas supracitadas, os feixes de fibras mielinizadas e as membranas basais vasculares são as vias de migração mais comumente utilizadas pelas células de tumores gliais. Devido ao GBM ser amplamente vascularizado e com grande capacidade angiogênica, o brotamento de capilares vasculares perpendiculares à superfície do tumor pode fornecer uma estrutura principal adicional para a disseminação tumoral (Giese, Westphal, 1996; Guillamo *et al.*, 2001).

1.2.2 Matriz extracelular na migração de gliomas

A MEC consiste em uma complexa rede de macromoléculas que atua como uma interface dinâmica entre as células e seu ambiente extracelular, e desempenha importante papel não apenas no preenchimento dos espaços entre as células, mas também na regulação do equilíbrio homeostático dos tecidos e manutenção das condições adequadas para homeostase celular, controlando a morfologia e fisiologia das células. Além do mais, participa da regulação da motilidade, diferenciação, proliferação, sinalização e sobrevivência celular. A MEC é composta por diversas proteínas, carboidratos e glicoproteínas imersas em um gel constituído de glicosaminoglicanas (GAGs) e proteoglicanas (Huber, O'Day, 2017).

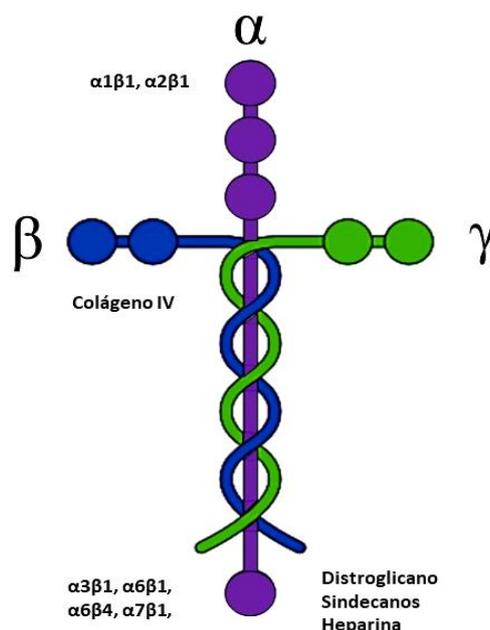
Diferente da matriz de outros tecidos, a MEC do cérebro adulto é escassa e possui uma quantidade insignificante de proteínas fibrilares, como os colágenos. Entretanto, apresenta altas concentrações de GAGs, o que explica sua consistência gelatinosa. Além das GAGs a MEC do cérebro é rica em componentes não-fibrilares como proteoglicanos, glicoproteínas, pequenas proteínas ligantes e proteínas matricelulares (Cuddapah *et al.*, 2014; Krishnaswamy *et al.*, 2019). É composta

majoritariamente por ácido hialurônico, com a presença de proteoglicanos, como os da família do sulfato de condroitina (agrecan, versican, neurocan e brevican), todos importantes durante a fase de desenvolvimento cerebral; e os da família de proteoglicanos ricos em leucina (decorin, biglican, fosfacan, testican, perlecan, distroglican, agrin, claustrin, glipican, etc) (De Luca, Papa, 2016; Jiang *et al.*, 2017).

A presença de proteínas fibrilares no SNC é restrita a áreas como espaço perivascular e glia limitante externa. A membrana basal ao redor dos vasos sanguíneos, em especial, é um excelente substrato para a migração e invasão de gliomas por apresentar pouca resistência e ser enriquecido com colágeno, e glicoproteínas adesivas como laminina, vitronectina e fibronectina (Cuddapah *et al.*, 2014).

Estudos mostram que a MEC ao redor do tumor é relevante para os processos de migração e invasão tumoral. É descrito na literatura que as células de glioblastoma *in vivo* e *in vitro* expressam e secretam proteínas da MEC no microambiente a sua volta, de modo a compensar a carência de substratos que favorecem o processo de migração das células tumorais no parênquima cerebral. Essa matriz é rica em proteínas que aumentam a motilidade celular como laminina, vitronectina, fibronectina e colágeno tipo IV (Vehlow, Cordes, 2013).

A laminina (LAM) é a glicoproteína adesiva mais abundante na membrana basal. As lamininas constituem uma grande família de proteínas que apresentam diferentes isoformas. Cada isoforma é composta de três longas cadeias polipeptídicas, as cadeias α , β e γ , que são unidas por pontes de dissulfeto e contorcidas entre si de modo a formar uma estrutura semelhante a uma cruz, como



pode ser observado na Figura 5 (Yao, 2016; Yap *et al.*, 2019).

Figura 5.
Representação esquemática da estrutura de laminina.

Nos vertebrados foram identificadas cinco cadeias α , três cadeias β e três cadeias γ produtos de diferentes genes, sendo que 16 isoformas de LAM já foram identificadas em mamíferos e outras 4 isoformas foram sugeridas baseado em estudos *in vitro* e *in vivo*, conforme Tabela 1. As lamininas podem se ligar entre si e a diferentes proteínas da MEC como o colágeno tipo IV e o heparan, formando, assim, uma complexa rede proteica. Além de organizar a rede de proteínas presente nas membranas basais, a LAM pode se ligar a receptores celulares (integrinas, distroglicanos ou sindecanos), servindo de ponte entre as células e membrana basal vascular (Durbeej, 2009; Yao, 2016).

Tabela 1. Isoformas de laminina e suas nomenclaturas, baseado em Yao, 2016.

Nomenclatura antiga	Nova nomenclatura	
	Padrão	Abreviada

Laminina-1	Laminina- $\alpha 1\beta 1\gamma 1$	Laminina-111
Laminina-2	Laminina- $\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Laminina-211
Laminina-3	Laminina- $\alpha 1\beta 2\gamma 1$	Laminina-121
Laminina-4	Laminina- $\alpha 2\beta 2\gamma 1$	Laminina-221
Laminina-5	Laminina- $\alpha 3\beta 3\gamma 2$	Laminina-332
Laminina-5B	Laminina- $\alpha 3\beta 3\gamma 2$	Laminina-3B32
Laminina-6	Laminina- $\alpha 3\beta 1\gamma 1$	Laminina-311
Laminina-7	Laminina- $\alpha 3\beta 2\gamma 1$	Laminina-321
Laminina-8	Laminina- $\alpha 4\beta 1\gamma 1$	Laminina-411
Laminina-9	Laminina- $\alpha 4\beta 2\gamma 1$	Laminina-421
Laminina-10	Laminina- $\alpha 5\beta 1\gamma 1$	Laminina-511
Laminina-11	Laminina- $\alpha 5\beta 2\gamma 1$	Laminina-521
Laminina-12	Laminina- $\alpha 2\beta 1\gamma 3$	Laminina-213
Laminina-13	Laminina- $\alpha 3\beta 2\gamma 3$	Laminina-323
Laminina-14	Laminina- $\alpha 4\beta 2\gamma 3$	Laminina-423
Laminina-15	Laminina- $\alpha 5\beta 2\gamma 3$	Laminina-523
	Laminina- $\alpha 2\beta 1\gamma 2$	Laminina-212
	Laminina- $\alpha 2\beta 2\gamma 2$	Laminina-222
	Laminina- $\alpha 3\beta 3\gamma 3$	Laminina-333
	Laminina- $\alpha 5\beta 2\gamma 2$	Laminina-522

A LAM participa de vários processos biológicos, como a regulação do ciclo celular, proliferação, adesão celular, espraiamento, polarização, migração, manutenção do fenótipo, resistência a apoptose, metástase tumoral e secreção de proteases. Para desempenhar essas funções, as lamininas interagem com receptores celulares que ativam diversas cascatas de sinalização intracelular. O principal grupo de receptores ligantes de LAM são as integrinas, especialmente as integrinas $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ (Maltseva, Rodin, 2018; Pereira *et al.*, 2005). Embora as integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ também possam se ligar a LAM (Durbeej, 2009).

Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento de diferentes isoformas de LAM no processo de transformação maligna de células tumorais. Em uma ampla variedade de cânceres os níveis e padrões de distribuição de lamininas são potenciais indicadores prognósticos. Em tumores, as lamininas promovem a adesão e migração celular, a descontinuidade da membrana basal facilitando o processo de invasão tumoral e formação de metástases intravasculares, a inibição do processo

de apoptose estimulado pela perda de contato entre as células e a MEC (*anoikis*), entre outros processos que colaboram para a progressão tumoral (Qin *et al.*, 2017).

A LAM pode ser encontrada na MEC de GBM e sua ação sobre as células tumorais deve-se a preservação de características de células-tronco e aumento da motilidade celular, além de colaborar para o elevado grau de invasividade tumoral (Coniglio, Segall, 2013; Wu *et al.*, 2016). Células de GBM produzem e secretam lamininas no parênquima tumoral de modo independente dos vasos sanguíneos (Tysnes *et al.*, 1999). Kawataki e colaboradores (2007) identificou a produção das lamininas: LAM1, LAM2, LAM5, LAM8 e LAM10 por linhagens de GBM e demonstrou a relação entre o aumento da migração e invasividade associado a expressão de algumas dessas isoformas.

O nível de expressão de lamininas está diretamente relacionado com o grau de malignidade tumoral em gliomas. Além disso, a isoforma de LAM presente no tumor também pode indicar o grau de agressividade, por exemplo, a LAM8 é mais expressa em gliomas de maior grau de malignidade enquanto a LAM9 é mais presente em gliomas menos agressivos (Ljubimova *et al.*, 2001). O aumento da expressão de LAM8 está relacionada a maior disseminação tumoral, menor tempo de ressurgimento do tumor após a cirurgia e, conseqüentemente, menor sobrevida dos pacientes (Ljubimova *et al.*, 2006). Mahersparan e colaboradores (1997) observou que, entre as proteínas de MEC analisadas, a laminina foi o mais potente estimulador da migração em linhagens de glioma humano.

Além da LAM, os gliomas produzem e secretam colágenos. Os colágenos compõem uma família heterogênea de proteínas composta por diversos tipos como: os colágenos fibrilares, os colágenos de ancoragem e os associados a fibrilas. No SNC, os colágenos são encontrados principalmente nas membranas basais, sendo o mais abundante o colágeno tipo IV (COL4). O COL4 é o segundo componente essencial da lâmina basal madura.

A molécula de COL4 consiste em três longas cadeias proteicas do tipo α sintetizadas individualmente que se unem formando uma estrutura semelhante a uma corda. Há seis isoformas de cadeias α de colágeno tipo IV, o que possibilitaria a formação de mais de 56 isoformas desta proteína. No entanto apenas 3 isoformas foram identificadas até o momento. As moléculas de colágeno interagem entre si através de seus domínios terminais formando uma rede que proporciona resistência à tração.

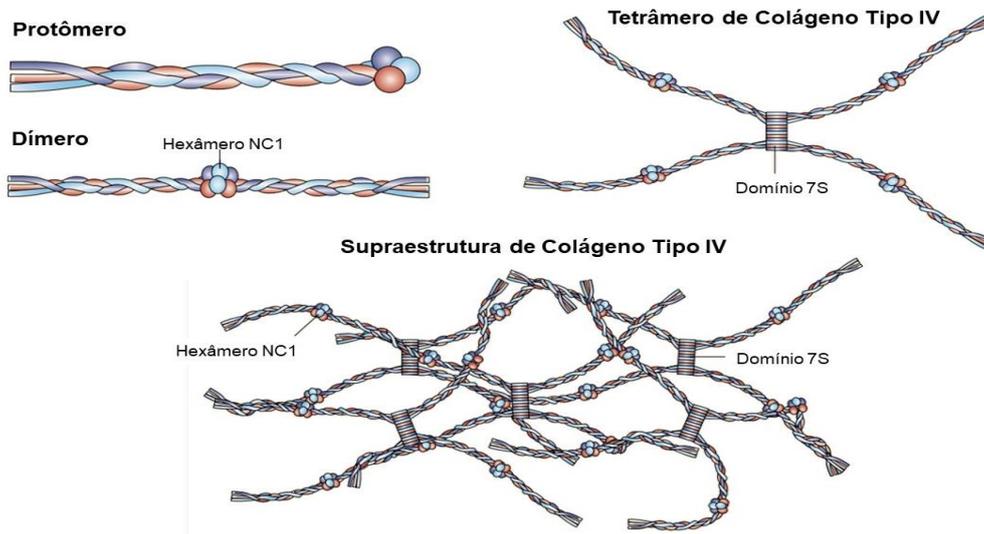


Figura 6. Formação das redes de colágeno tipo IV, Adaptado de Kalluri 2003.

O COL4 participa de vários processos celulares como controle do ciclo celular, proliferação e morte celular (Eyden, Tzaphlidou, 2001; Jiang *et al.*, 2017). A presença de colágenos na MEC de gliomas está intimamente relacionada com o grau do tumor e o nível de invasividade tumoral (Pencheva *et al.*, 2017). COL4 foi identificado em MEC derivada de tecido descelularizado originado de biópsias de pacientes com GBM (Koh *et al.*, 2018). Esferoides de linhagens de GBM humano produziram COL4 *in vitro* quando co-cultivadas com agregados de células cerebrais normais (Knott *et al.*, 1998). Mahesparan e colaboradores (1999) mostraram que COL4 estimulou a migração de células de esferoides originados de 7 das 10 biópsias analisadas de pacientes com GBM.

Entre os substratos de MEC envolvidos no estímulo da migração celular em gliomas destaca-se a fibronectina (FN). A fibronectina é uma glicoproteína adesiva cuja estrutura consiste em um dímero composto por duas subunidades quase idênticas de 250 kDa cada. Essas subunidades são ligadas covalentemente por um par de ligações dissulfeto na região próxima a porção C-terminal. Cada monômero de FN consiste em três tipos de unidades repetitivas denominadas repetições FN, são elas as repetições do tipo I, II e III. Embora as moléculas de FN sejam produtos de um único gene, a proteína resultante pode existir em várias formas que surgem do *splicing* alternativo de um único pré-mRNA, de modo que pode haver até 20 variantes no FN humano (Pankov, Yamada, 2002).

específico. Desempenha importante papel na migração e crescimento neuronal durante o desenvolvimento e na regeneração nervosa após lesão (Venstrom, Reichardt, 1993). Apesar de altamente expressa no cérebro durante o desenvolvimento, a FN é pouco expressa no cérebro normal maduro estando presente apenas nas membranas basais e na glia limitante externa (Giese, Westphal, 1996; Guillamo *et al.*, 2001).

A expressão gênica de FN é maior em amostras de GBM do que no cérebro normal (Lal *et al.*, 1999) e em astrocitomas pilocíticos não invasivos. O que indica que a expressão de FN possui relação direta com o perfil invasivo e grau de malignidade tumoral de astrocitomas (Colin *et al.*, 2006). FN foi encontrada em MEC derivada de tecido descelularizado originado de biópsias de pacientes com GBM (Koh *et al.*, 2018), e foi produzida *in vitro* por linhagens de GBM co-cultivadas com agregados de células cerebrais normais (Knott *et al.*, 1998). Na MEC de GBM a presença de FN é crítica para a manutenção da morfologia, proliferação e diferenciação celular (Gong *et al.*, 2017). Além do mais, FN aumenta a adesão e motilidade celular em gliomas. Sendo, portanto, um potente estimulador da migração celular em GBM tanto de linhagens estabelecidas quanto de culturas primárias (Mahesparan *et al.*, 1997; Mahesparan *et al.*, 1999).

Vitronectina (VTN) é uma glicoproteína adesiva com peso molecular de 75 kDa, predominantemente encontrada no plasma e na membrana basal vascular. A VTN possui uma sequência RGD através da qual medeia a ligação e a propagação de células na MEC através de receptores específicos de integrina. A maior parte da molécula de VTN acomoda seis repetições de hemopexina. Sua estrutura contém duas seqüências consenso para a ligação à heparina. Foi relatado que a VTN se liga ao colágeno por meio de grupos funcionais de duas regiões distintas, uma adjacente à sequência RGD e outra adjacente ao domínio de ligação à heparina. A extremidade C-terminal da VTN acomoda seu local de ligação ao plasminogênio (Schvartz *et al.*, 1999).

Essa glicoproteína desempenha papel importante na inflamação, adesão celular, necrose celular, coagulação sanguínea e regula a angiogênese induzida pelo fator de crescimento endotelial. No SNC, esta molécula é expressa durante o desenvolvimento neural e participa na diferenciação dos neurônios motores da medula espinhal. A VTN é um dos principais componentes organizadores da MEC e

desempenha um importante papel na formação e crescimento tumoral (CHEN *et al.*, 2016).

VTN foi detectada no parênquima tumoral de biópsias de GBM e astrocitoma anaplásico (grau III). Em contrapartida, VTN não foi detectada em biópsias de astrocitomas de baixo grau, cortes de substância branca e cortex cerebral sadio. Dessa forma, pode-se concluir que esta proteína é expressa apenas em astrocitomas mais agressivos e que sua expressão está diretamente relacionada com o grau de malignidade tumoral (Gladson, Cheresch, 1991). Pesquisas indicam que VTN desempenha papéis significativos na progressão de GBM servindo como um importante substrato adesivo (Gladson, Cheresch, 1991; Giese *et al.*, 1994), estimulando a migração celular (Mahesparan *et al.*, 1999) e exercendo efeito anti-apoptótico de maneira dose-dependente (Uhm *et al.*, 1999).

1.2.3 Integrinas em gliomas

Interações entre as células e a MEC são mediadas, principalmente, por uma família de 24 proteínas de adesão transmembranares chamadas integrinas (ITGs). As ITGs são receptores heterodiméricos formados pela combinação de 18 subunidades α e 8 subunidades β conectadas por ligações não covalentes. Cada uma das subunidades das integrinas é composta por um grande domínio extracelular, uma porção intramembranar em forma de hélice de passagem única e um pequeno domínio citoplasmático. As ITGs são responsáveis pela comunicação bidirecional entre o ambiente extracelular e vias intracelulares (Hamidi, Ivaska, 2018; Kechagia *et al.*, 2019).

O estado conformacional determina a afinidade da ITG para proteínas da MEC. A ITG dobrada (fechada) representa a forma inativa, com baixa afinidade por ligantes da MEC, já a ITG estendida (aberta) é a forma ativa e capaz de se ligar a elementos da MEC provocando, assim, sinalização e respostas celulares, vide Figura 9. A interação da ITGs com componentes da MEC pode ocorrer através de sítios de ligação presentes em ambas subunidades da ITG ou por meio de um domínio específico da subunidade α (Hamidi, Ivaska, 2018; Kechagia *et al.*, 2019).

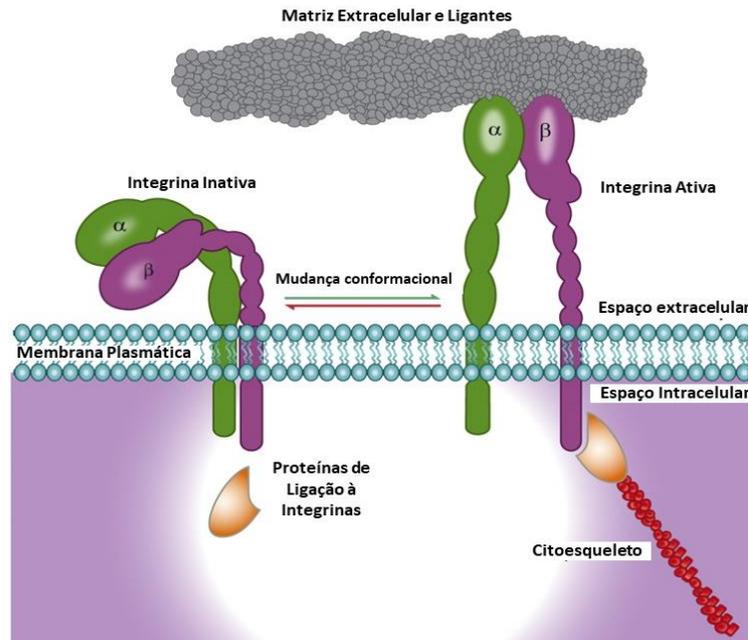


Figura 8. Representação esquemática de integrina inativa e ativa.

Algumas ITGs reconhecem exclusivamente um componente da MEC, por exemplo, a integrina $\alpha 5\beta 1$ reconhece apenas a fibronectina. Enquanto outras ITGs têm a capacidade de se ligar a diferentes proteínas, como a integrina $\alpha v\beta 3$ que pode reconhecer a vitronectina, fibronectina, fibrinogênio e trombospondina. Além disso, um mesmo ligante de MEC pode ser reconhecido por mais de uma ITG, e a ligação de cada ITG ao mesmo ligante pode desencadear vias de sinalização intracelulares distintas. Dessa forma, o padrão de expressão de ITGs na superfície celular é relevante para determinar a resposta celular à estímulos microambientais (Hamidi, Ivaska, 2018).

A ativação da ITG e sua ligação a proteínas da MEC desencadeia o recrutamento de proteínas de sinalização, ancoragem e de citoesqueleto formando um dinâmico complexo proteico nas caudas citoplasmáticas das ITGs que medeiam a adesão celular e regulam aspectos celulares como sobrevivência, migração, polaridade e diferenciação. Alterações na adesão e sinalização desencadeadas pelas ITGs podem promover o surgimento de patologias como doenças cardiovasculares e câncer (Hamidi, Ivaska, 2018).

Em GBM a expressão das subunidades de ITG $\alpha 3$, αv , $\beta 1$ e $\beta 3$ e das ITGs $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ e $\alpha v\beta 8$ estão aumentadas em comparação com o tecido cerebral sadio. Os níveis de expressão das ITGs $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha v\beta 3$,

$\alpha\beta 5$ e $\alpha\beta 8$ estão diretamente relacionados com o grau de malignidade em gliomas. A expressão elevada de $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha\beta 3$ e $\alpha 3\beta 1$ está correlacionada com o pior prognóstico e menor taxa de sobrevivência de pacientes com GBM. As ITGs $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha 6\beta 1$ estão envolvidas com o fenótipo altamente invasivo de células de GBM e a expressão desses receptores aumentou a invasão de células U87MG *in vitro* e *in vivo*. Além disso, $\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$, $\beta 1$ estão associadas com a angiogênese em GBM. A ITG $\alpha\beta 3$ está relacionada a resistência a irradiação, enquanto que as ITGs $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ estão superexpressas em células de glioma resistente a múltiplas drogas (Malric *et al.*, 2017; Vehlow, Cordes, 2013). As ITGs relevantes em GBM e que possuem como ligantes as proteínas de MEC laminina, colágeno tipo IV, fibronectina e vitronectina estão listadas na Tabela 3.

Tabela 2. Integrinas em GBM

Integrinas	Ligantes	Papel em GBM
$\alpha 1\beta 1$	Laminina, colágeno IV	Migração Invasão
$\alpha 2\beta 1$	Laminina, colágeno IV	Migração Invasão Resistência a quimioterapia
$\alpha 3\beta 1$	Laminina, Fibronectina e colágeno IV	Migração Invasão Características de células-tronco Resistência a quimioterapia Marcador prognóstico
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectina	Migração Invasão Resistência a quimioterapia
$\alpha 6\beta 1$	Laminina	Invasão
$\alpha v\beta 3$	Fibronectina e vitronectina	Migração Invasão Angiogênese Sobrevivência celular Resistência a terapia Marcador prognóstico
$\alpha v\beta 5$	Vitronectina	Marcador prognóstico

1.3 Ciclo-oxigenases

As ciclo-oxigenases (COXs), também chamadas de prostaglandina endoperóxido sintases (PGHS), são enzimas bifuncionais (oxigenase e peroxidase) responsáveis por catalisar a conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (PGs) e tromboxano A₂ (TXA₂) (Seo e Oh, 2017). Há três isoformas de COX: ciclooxigenase 1 (COX-1), ciclooxigenase 2 (COX-2) e ciclooxigenase 3 (COX-3) (Wang *et al.*, 2007).

A COX-1 foi purificada a primeira vez em frações de membranas de glândulas vesiculares de bois e ovelhas em meados da década de 1970. É codificada por um gene localizado no cromossomo 9. A proteína madura possui 574 aminoácidos e é expressa constitutivamente em quase todos os tecidos. A COX-1 é uma proteína bastante estável e envolvida na produção de prostanoides necessários para regulação da homeostase vascular, citoproteção gástrica e a respostas a estimulação hormonal (Rouzer, Marnett, 2009; Seo, Oh, 2017; Smith, Murphy, 2016).

A COX-2 foi descoberta em 1991 em células murinas 3T3. Seu gene está localizado no cromossomo 1. Sua expressão ocorre geralmente após estímulos específicos como citocinas, promotores tumorais e fatores de crescimento, sendo a COX-2 considerada a isoforma induzida de COX. Embora a COX-2 esteja geralmente associada a síntese de prostanoides durante processos patológicos como inflamação e tumorigênese, ela é também constitutivamente expressa de modo tecido específica nos rins, trato gastrointestinal, cérebro, aparelho reprodutor feminino, timo e estômago (Rouzer, Marnett, 2009; Seo, Oh, 2017; Smith, Murphy, 2016).

A COX-3 foi identificada em 2002 no córtex cerebral de cachorro e posteriormente no coração e cérebro humanos. É codificada pelo gene da COX-1, sendo que o intron-1 não é removido durante o splicing. A COX-3 é uma proteína de tamanho aproximado de 65 kDa e supostamente ativa no SNC (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Porém, a existência de uma terceira isoforma de COX funcional e cataliticamente ativa ainda seja contestada por alguns pesquisadores que acreditam que a COX-3 seja apenas uma variação da COX-1 (Davies *et al.*, 2004; Dinchuk *et al.*, 2003; Kis *et al.*, 2005; Simmons *et al.*, 2004)

A COX-1 e COX-2 de uma mesma espécie têm 60% de homologia. Ambas são proteínas homodímeras de aproximadamente 72kDa. Cada monômero da COX possui três domínios principais:

1. um domínio próximo ao N-terminal semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF);
2. uma região contínua de 70 aminoácidos que serve de domínio de ligação à membrana.
3. um domínio catalítico globular na extremidade C-terminal.

As COXs estão localizadas na superfície luminal do retículo endoplasmático (RE) e ambas superfícies do envoltório nuclear. Elas interagem apenas com uma das superfícies da bicamada lipídica através de quatro hélices curtas de natureza anfipática presentes em seus domínios de ligação à membrana. Embora sejam homodímeros, em solução os monômeros das COXs sofrem mudança conformacional formando heterodímeros conformacionais. Desta forma, em vez de dois sítios catalíticos, um de cada monômero, as COXs possuem um monômero com ação regulatória (monômero alostérico), e outro com atividade catalítica (Smith, Murphy, 2016).

Dentre as diferenças estruturais entre a COX-1 e a COX-2 pode-se citar o que a COX-2 possui uma extensão de 18 aminoácidos na porção C-terminal, que é associada a sua degradação no retículo endoplasmático. Essa característica faz da COX-2 uma proteína menos estável que a COX-1 (Seo, Oh, 2017; Smith, Murphy, 2016). A COX-2 possui também um sítio ativo cerca de 20% maior do que o da COX-1, o que possibilitou o desenvolvimento de inibidores específicos para COX-2 (Smith *et al.*, 2000). A COX-3 possui todas as características catalíticas e os aspectos estruturais mais relevantes das COX-1 e COX-2 (Chandrasekharan *et al.*, 2002).

A COX-1 é expressa e amplamente distribuída no cérebro sadio, sendo prevalente no prosencéfalo onde pode estar envolvida na modulação do sistema nervoso autônomo e processamento sensorial (Vane *et al.*, 1998). Estudos apontam que a expressão de COX-1 é relevante para a progressão de carcinoma de ovário, visto que a inibição seletiva dessa isoforma colaborou para a redução da proliferação celular e aumento da apoptose (Daikoku *et al.*, 2005). Em carcinoma de pulmão de células não pequenas a inibição de COX-1 diminuiu a proliferação celular

(Li *et al.*, 2009). Em gliomas, o aumento da expressão de COX-1 restringiu-se a células do sistema imune como microglia e macrófagos presentes no parênquima tumoral e área de infiltração tumoral, não sendo observada a expressão de COX-1 em células tumorais e nem sua relação com o grau de malignidade tumoral (Deininger *et al.*, 1999).

A COX-2 é encontrada em diversas regiões do cérebro como córtex, hipocampo e hipotálamo, e é produzida por neurônios, astrócitos, células da microglia e células do plexo coroide (Vane *et al.*, 1998). No cérebro o PGH₂ sintetizado a partir da ação da COX-2 é geralmente convertido em PGE₂, de modo que ambas COX-2 e PGE₂ participam da regulação dos processos de aprendizado e memória (Rall *et al.*, 2003; Teather *et al.*, 2002), controle do ciclo sono/vigília (Gerozissis *et al.*, 1995; Hayaishi, Matsumura, 1995) e termorregulação (Ivanov, Romanovsky, 2004).

Em 1999, Deininger e colaboradores identificou pela primeira vez a presença das COXs em gliomas. Foi observado o aumento da expressão de COX-2 em células do sistema imune presentes no tumor, assim como, em células tumorais indicando um possível papel de COX-2 neste tipo tumoral. Desde então, muitos trabalhos tem demonstrado a relação direta da expressão de COX-2 em GBM com a proliferação (Gomes, Colquhoun, 2012; Prayson *et al.*, 2002), fenótipo migratório e invasivo (Gomes, Colquhoun, 2012; Tafani *et al.*, 2011), grau de malignidade tumoral (Joki *et al.*, 2000), recorrência tumoral após radioterapia (Sminia *et al.*, 2005), maior malignidade e pior prognóstico (Panagopoulos *et al.*, 2018; Shono *et al.*, 2001; New, 2004).

1.4 Via das ciclo-oxigenases

Os prostanoides (prostaglandinas e tromboxanos) são formados pela via da COX. Prostanoides são lipídios bioativos semelhantes a hormônios, compostos por uma cadeia de 20 carbonos, que possuem ação autócrina e parácrina. Por isso, diferente dos hormônios liberados na corrente sanguínea, os prostanoides são sintetizados e liberados em praticamente todos os órgãos. Os prostanoides foram descobertos como substâncias com atividades vasoativas no músculo liso do sistema reprodutivo masculino, devido a isso o nome prostanóide (Gomes *et al.*, 2018; Smith, Murphy, 2016).

Os prostanoídes coordenam vários processos fisiológicos como relaxamento e contração de músculo liso, regulação da coagulação sanguínea, manutenção da homeostase renal, modulação da resposta imune, inibição ou estimulação de liberação de neurotransmissores, regulação da secreção do trato gastrointestinal, motilidade e proteção da mucosa gastrointestinal. Já em condições patológicas, são envolvidos com inflamação, doenças cardiovasculares e desenvolvimento tumoral (Gomes *et al.*, 2018).

Quando um estímulo externo como bradicinina, angiotensina II, trombina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), interleucina beta 1 (IL-1 β), citocinas, promotores tumorais ou fatores de crescimento ativam receptores de superfície celular específicos, promovem o aumento da concentração de Ca²⁺ citosólico e consequente ativação de uma ou mais fosfolipases celulares. Embora várias lipases possam participar da mobilização do principal substrato das COXs, o ácido araquidônico (AA), as mais relevantes são a fosfolipase citosólica (cPLA_{2 α}) cálcio dependente e os grupos IIA e V das fosfolipases secretadas (sPLA_{2s}) (Smith, Murphy, 2016).

A isoforma predominante de fosfolipases é a cPLA_{2 α} presente no citosol de células em repouso. O Ca²⁺ presente no citoplasma se liga na região N-terminal de cPLA_{2 α} no domínio CalB, em seguida o complexo Ca²⁺/CalB se liga nas membranas intracelulares, promovendo a translocação de cPLA_{2 α} para as membranas do aparelho de Golgi, RE e envoltório nuclear. A atividade de cPLA_{2 α} é regulada pela fosforilação por uma variedade de quinases. Uma vez ativada a cPLA_{2 α} libera o AA através de hidrólise na posição sn2 dos glicerofosfolipídios localizados na superfície das membranas intracelulares. O AA recém-liberado pode cruzar a bicamada da membrana onde pode entrar no sítio ativo da enzima COX presente na porção luminal das membranas intracelulares. (Gomes *et al.*, 2018; Smith, Murphy, 2016).

As COXs possuem duas atividades enzimáticas diferentes, a de oxigenase e peroxidase. Essas atividades ocorrem em sítios distintos, mas interativos dentro da proteína. Inicialmente, a COX catalisa a formação de um intermediário lipídico instável, a prostaglandina G₂ (PGG₂) a partir do AA e duas moléculas de O₂ numa reação de oxidação. A PGG₂ é rapidamente convertida em PGH₂ pela redução de 2 elétrons do seu grupo 15-hidroperóxil, catalisada pela atividade peroxidase da COX (Gomes *et al.*, 2018; Smith, Murphy, 2016).

1.5 Prostaglandina E₂ (PGE₂)

O principal produto da via da COX é a prostaglandina E₂ (PGE₂). PGE₂ é essencial para homeostase e importante mediador imunopatológico em infecções crônicas, regulando vários aspectos no processo inflamatório, incluindo as múltiplas funções de algumas células imunes. Esta prostaglandina apresenta um paradoxo em suas funções, pois por vezes desempenha funções pró-inflamatórias nas fases iniciais da inflamação como a ativação de neutrófilos, macrófagos e mastócitos. Em outros momentos, atua como imunossupressor, suprimindo a imunidade inata e específica a nível molecular e celular (Wang *et al.*, 2017).

A conversão de PGH₂ em PGE₂ ocorre pela ação de uma de suas três sintases específicas a prostaglandina E sintase-1 microsomal (mPGES-1), a prostaglandina E sintase-2 microsomal (mPGES-2) e a prostaglandina E sintase citosólica (cPGES). A mPGES-2 e a cPGES são expressas constitutivamente, enquanto que a mPGES-1 é a principal enzima para a conversão *in vivo* de PGH₂ em PGE₂ em processos fisiopatológicos. A mPGES-1 é geralmente co-regulada com a COX-2, incluindo no cérebro, devido a isso o PGE₂ é o principal prostanóide oriundo da ativação da COX-2 no cérebro e em processos fisiopatológicos como inflamação, febre, dor, reparação tecidual e câncer. Enquanto a mPGES-1 atua, preferencialmente, na conversão de PGH₂ em PGE₂ associada a COX-2, as sintases mPGES-2 e cPGES são associadas, principalmente, a atividade da COX-1 (Seo, Oh, 2017; Smith, Murphy, 2016).

As sintases de PGE₂ microsomais pertencem a família de proteínas associadas a membrana no metabolismo de eicosanóides e glutatona (MAPEG). A mPGES-1 é uma proteína de peso molecular entre 15 e 18 kDa, enquanto a mPGES2 tem mais de 30 kDa. A cPGES é uma proteína citosólica de 26 kDa que requer a glutatona como cofator para sua atividade enzimática. O papel desta enzima na produção de PGE₂ não está bem estabelecido, já que o knockout de cPGES não leva a diminuição significativa da produção total de PGE₂ (Seo, Oh, 2017; Smith, Murphy, 2016).

Após sua síntese PGE₂ é exportado para o meio extracelular, na maioria das vezes, via transportadores da família ABC. Uma vez no ambiente extracelular, a PGE₂ pode se ligar a um dos seus quatro receptores de membrana específicos EP1, EP2, EP3 e EP4 desencadeando diversas vias de sinalização. Esses receptores

podem ser divididos em 3 classes: 1) os receptores acoplados a proteína G estimulatória (Gs), são eles EP2 e EP4; 2) receptor acoplados a proteína Gq, EP1; e o 3) receptor acoplado a proteína G inibitória (Gi), EP3. Quando EP2 ou EP4 são ativados ocorre o estímulo da produção de AMP cíclico (AMPc) pela ação da adenilato ciclase (AC), essa ativação leva a alterações como relaxamento dos vasos sanguíneos. Em contrapartida, quando EP1 é ativado, ocorre o aumento intracelular de Ca^{2+} acarretando em vasoconstrição. Já o receptor EP3 promove a inibição da AC levando a uma redução da concentração de AMPc (Gomes *et al.*, 2018).

Os níveis de PGE_2 são controlados não apenas pela regulação de sua síntese, mas também pela sua degradação. O passo inicial para a inativação de PGE_2 consiste em sua oxidação para formação do componente 15-keto- PGE_2 em uma reação catalisada por uma família de enzimas 15-hidroxi prostaglandinas desidrogenases. O catabolismo envolve a redução da dupla ligação entre o carbono 13 (C-13) e o carbono 14 (C-14), seguida de ω - e β -oxidação. As enzimas 15-hidroxi prostaglandinas desidrogenases são reconhecidas como sendo supressoras tumorais por promoverem a redução dos níveis de PGE_2 (Smith, Murphy, 2016).

Diversos estudos têm demonstrado a participação de PGE_2 em diferentes mecanismos envolvidos na progressão de vários tipos câncer como o de colón (Wang *et al.*, 2005), pulmão (Krysan *et al.*, 2005), mama (Zhou *et al.*, 2005) e cérebro (Gomes, Colquhoun, 2012). Em gliomas, está diretamente relacionado com o grau de malignidade tumoral, estímulo da proliferação e sobrevivência celular (Brocard *et al.*, 2015; Gomes, Colquhoun, 2012), aumento da migração (Gomes e Colquhoun, 2012) e radio-resistência (Huang *et al.*, 2015; Matsuo *et al.*, 2004).

Foi observado o aumento da expressão das sintases de PGE_2 mPGES-1, mPGES-2 e cPGES em amostras de gliomas de pacientes, assim como, a correlação da expressão dessas enzimas com o grau de malignidade tumoral. A sintase mPGES-1 tem maior expressão em gliomas de grau II recorrentes (Mattila *et al.*, 2009). Nosso grupo de pesquisa, constatou que o aumento da expressão gênica de mPGES-1 está diretamente relacionado com o menor tempo de sobrevida dos pacientes com GBM. Da mesma maneira, a diminuição da expressão de 15-HPGD está associada a menor sobrevida destes pacientes (Panagopoulos *et al.*, 2018).

1.6 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES)

A síntese de prostaglandinas pode ser inibida por anti-inflamatórios esteroides ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Os anti-inflamatórios esteroides inibem apenas a COX-2 bloqueando sua síntese a nível transcricional (Smith e Murphy, 2016). Os AINEs clássicos não seletivos inibem as duas isoformas de COX através de um das três diferentes formas: 1) modificação covalente (ex. a aspirina), 2) ligação rápida e reversível (ex. ibuprofeno) ou 3) ligação rápida e de menor afinidade, seguida de ligação dependente do tempo, alta afinidade e ligação lentamente reversível (ex. flurbiprofeno) (Vecchio, Malkowshi, 2012).

As COX-1 e COX-2 são enzimas que apresentam 61% dos aminoácidos idênticos e homologia de 90% dos aminoácidos presentes no sítio catalítico. Devido a isso, há poucos alvos com potencial para a inibição seletiva de uma das isoformas. Em COX-1 a isoleucina na posição 523 foi substituída por uma valina em COX-2 e essa diferença estrutural consiste no principal alvo dos inibidores seletivos (Figura 10). Outra diferença entre as enzimas que possibilitou o desenvolvimento de fármacos para a inibição específica de COX-2 foi a ausência de um grupo metil no sítio ativo dessa isoforma. Desse modo, o sítio catalítico da COX-2 é cerca de 20% maior do que o da COX-1 o que faz com que drogas volumosas como o rofecoxibe e celecoxibe, que apresentam três anéis cíclicos em suas estruturas, não consigam acessar o sítio de COX-1 (Hawkey, 2001).

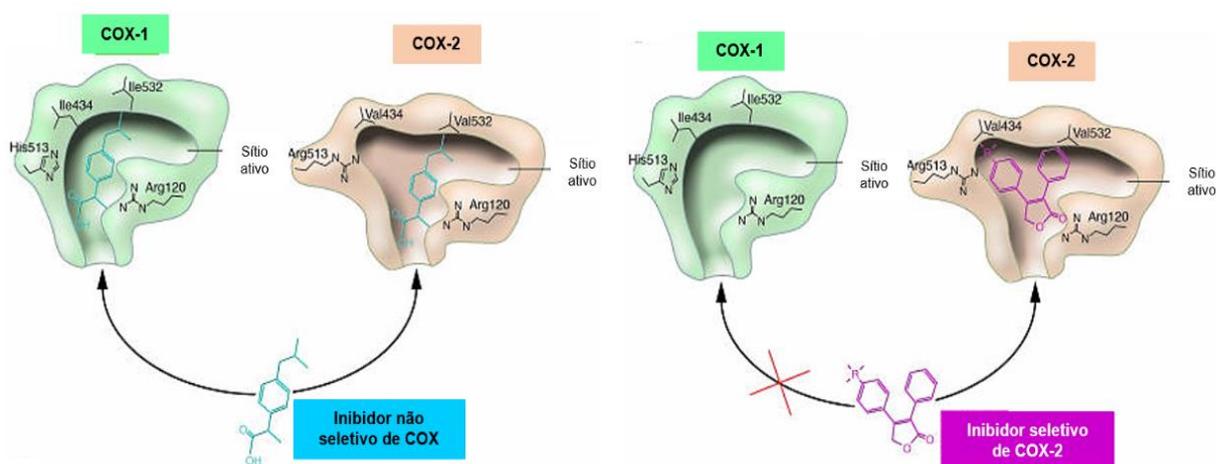


Figura 10. Representação esquemática das diferenças estruturais entre os canais de ligação ao substrato da COX-1 e COX-2 que permitiram o desenho de inibidores seletivos, adaptado de Grosser et al., 2006.

A aspirina é o único AINE que inibe a enzima COX de maneira irreversível, para isso a aspirina se liga ao sítio ativo da COX e acetila a serina 530 (Ser530) e essa acetilação interfere na ligação do AA. No entanto, a COX-2 mantém a capacidade de catalisar a oxidação de AA levando a formação do ácido 15-hidroperóxido eicosatetraenoico (15-HETE) em vez de PGG₂. Esse intermediário lipídico serve de substrato para a via das lipoxigenases (LOX), formando lipídios poli-hidroxilados conhecidos como lipoxinas e resolvinas desencadeadas por aspirina. Esses lipídios tem ação anti-inflamatória que auxiliam nos efeitos clínicos da aspirina (Rouzer, Marnett, 2009).

O Ibuprofeno (IBP) é um AINE que inibe a COX quase que instantaneamente e de maneira reversível. Para que haja inibição da atividade catalítica de COX o IBP deve se ligar a ambos monômeros da enzima. O IBP é rapidamente removido do sítio ativo de COX quando as concentrações da droga diminuem (Varrassi *et al.*, 2019).

O uso AINEs inespecíficos ocasionou efeitos colaterais como úlceras gástricas, falência renal aguda, falência renal crônica, hipertensão, nefrite intersticial crônica, retenção de sódio e fluidos (Balley *et al.*, 2018; Hawkey, 2001), infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e risco de mortalidade aumentada. A ocorrência desses efeitos adversos tornou necessário o desenvolvimento de fármacos capazes de inibir apenas uma das duas isoformas de COX (Dubois *et al.*, 1998).

Diferenças estruturais entre as duas isoformas de COX, como o tamanho do sítio catalítico e os resíduos de aminoácidos isoleucina (Ile) em COX-1 e valina (Val) em COX-2, possibilitou o desenvolvimento de fármacos para a inibição de cada isoforma isoladamente (Seo, Oh, 2017). Como exemplo, pode-se citar inibidores como o SC-560 possuem maior afinidade por COX-1 e inibem especificamente essa isoforma quando administrados em baixas concentrações. Uma nova linha de AINEs, chamados de coxibes, foi desenvolvida visando a redução dos efeitos indesejáveis através da inibição específica da COX-2. Exemplos de AINEs inibidores específicos da COX-2 são o celecoxibe e o NS-398.

Na época vários estudos mostraram que há alta expressão de COX-2 em vários tipos de câncer e houve vários estudos clínicos em larga escala explorando os benefícios do uso crônico de celecoxibe ou rofecoxibe para a prevenção da recorrência de vários tipos de tumor, incluindo pólipos de cólon e glioblastoma.

Esses estudos, confirmaram o valor dos coxibs para este propósito, porém revelaram o aumento significativo da toxicidade cardiovascular associada ao uso crônico. Neste período, rofecoxibe e valdecoxibe foram retirados do mercado (Rouzer, Marnett, 2009).

Pesquisas têm sido desenvolvidas, buscando-se uma nova classe de AINE que module a formação de prostaglandinas através da modulação da atividades das sintases específicas. Uma alternativa que tem sido bastante estudada é a inibição da sintase de PGE₂ (principal mediador lipídico em processos patológicos) mPGES-1. Com a inibição de mPGES-1 acredita-se que haverá redução de efeitos colaterais cardiovasculares devido essa enzima não alterar a produção de PGI₂, uma prostaglandina importante para a manutenção da homeostase cardiovascular. Um exemplo de inibidor específico de mPGES-1 amplamente utilizado em pesquisas científicas é a droga CAY10526.

1.7 Justificativa

Neste estudo, hipotetizamos que as enzimas COX-1 e COX-2 regulam, através da ação de PGE₂, a expressão de proteínas da MEC, assim como, de seus respectivos receptores a fim de promover a migração e invasão celular em GBM. Para investigar se a inibição das COXs reduzem a migração celular e se a inibição farmacológica da síntase específica de PGE₂ (prostaglandina E sintase-1 microsossomal) apresenta efeitos similares, tratamos as linhagens de glioblastoma humano U87MG e T98G com o inibidor inespecífico de COX (ibuprofeno), o inibidor seletivo de COX-1 (SC560), o inibidor seletivo de COX-2 (NS298), o inibidor da mPGES-1 (CAY10526) e com PGE₂ exógeno. Posteriormente, observamos os efeitos de cada tratamento sobre a migração celular e expressão das proteínas de MEC: colágeno tipo IV (COL4), fibronectina (FN), expressão de vitronectina (VTN) e laminina (LAM), assim como, seus receptores integrinas α v (ITGAV), α 3 (ITGA3), α 5 (ITGA5), β 1 (ITGB1) e β 3 (ITGB3).

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste projeto mostram que COXs e mPGES-1 desempenham um papel no crescimento celular, reorganização do citoesqueleto, expressão de proteínas da MEC e ITGs, assim como, migração celular em linhagens de GBM.

- A inibição de mPGES-1 reduziu o número de células das linhagens U87MG e T98G em uma concentração 4 vezes inferior a concentração necessária do inibidor de COX, ibuprofeno. PGE₂ estimulou o crescimento celular.
- Inibidores seletivos de COX-1 e COX-2, assim como, o inibidor de mPGES-1 reduziu a migração das células de GBM *in vitro* de modo mais acentuado que ibuprofeno. PGE₂ aumentou a migração das células U87MG, mas não das células T98G.
- A inibição de mPGES-1 ou inibição seletiva de COX-1 e COX-2 promoveram remodelamento do citoesqueleto das células U87MG e T98G. Esses dados sugerem que a redução da migração celular promovida por SC560 deve-se, em parte, a imobilização dessas células pela produção de fibras de estresse. Enquanto, CAY10526 desestruturou os filamentos de actina de modo a dificultar a migração celular. PGE₂ não causou remodelamento do citoesqueleto.
- A inibição de mPGES-1 promoveu a redução da expressão das proteínas da MEC e seus receptores. Nas linhagens estudadas, o inibidor de mPGES-1 reduziu a expressão de duas subunidades de ITGs muito relevantes para a invasão, migração e agressividade em GBM. Foram elas as ITGs $\beta 1$ e αv . Estudos clínicos têm demonstrado que a inibição da ITG αv acarreta na regressão tumoral em pacientes com GBM. Esses dados sugerem que mPGES-1 é um potencial alvo terapêutico em GBM.

- A inibição de COX modulou de diferentes formas a expressão das proteínas da MEC e seus receptores.
- Na maioria das vezes, o tratamento das células com PGE₂ não alterou a expressão gênica ou proteica das proteínas da MEC e seus receptores.

Em conjunto, os resultados sugerem a inibição de mPGES-1 apresenta resultados similares ou superiores aos observados com a inibição seletiva de COX. Dessa maneira, mPGES-1 é um possível alvo para terapia adjuvante em GBM.

REFERÊNCIAS

Aggarwal A, Al-Rohil RN, Batra A, Feustel PJ, Jones DM, DiPersio CM. Expression of integrin $\alpha 3\beta 1$ and cyclooxygenase-2 (COX2) are positively correlated in human breast cancer. *BMC Cancer* 2014 Jun; 14:459. doi: 10.1186/1471-2407-14-459

Ahmed S, Kim Y. PGE2 mediates cytoskeletal rearrangement of hemocytes via Cdc42, a small G protein, to activate actin-remodeling factors in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch Insect Biochem Physiol*. 2019 Dec; 102(4): e21607. doi: 10.1002/arch.21607. Epub 2019 Jul 23.

American Type Culture Collection (ATCC). T98G (ATCC® CRL-1690™). Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1690.aspx>>. Acessado em: 17.07.2017.

American Type Culture Collection (ATCC). U87MG (ATCC® HTB-14™). Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/HTB-14.aspx>>. Acessado em: 17.07.2017.

Barlow M, Edelman M, Glick RD, Steinberg Bettie M, Soffer SZ. Celecoxib inhibits invasion and metastasis via a cyclooxygenase 2-independent mechanism in an in vitro model of Ewing sarcoma. *J Pediatric Surg*. 2012 Jun; 47(6): 1223-1227. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.03.031>

Benadiba M, de M Costa I, Santos RL, Serachi FO, de Oliveira Silva D, Colquhoun A. Growth inhibitory effects of the Diruthenium-Ibuprofen compound, [Ru2Cl(lbp)4], in human glioma cells in vitro and in the rat C6 orthotopic gliomas in vivo. *J Biol Inorg Chem*. 2014 Aug;19(6):1025-35. doi: 10.1007/s00775-014-1143-4. Epub 2014 May 14.

Bottone FG Jr, Martinez JM, Alston-Mills B, Eling TE. Gene modulation by COX-1 and COX-2 specific inhibitors in human colotectal carcinoma cancer cells. *Carcinogenesis*. 2004 Mar; 25(3): 349-57. doi: 10.1093/carcin/bgh016. Epub 2003 Nov 21.

Brocard E, Oizel K, Lalier L, Pecqueur C, Paris F, Vallette FM, et al. Radiation-induced PGE₂ sustains human glioma cells growth and survival through EGF signaling. *Oncotarget* 2015; 6(9):6840-6849.

Caffo O, Veccia A, Russo L, Galligioni E. Brain metastases from prostate cancer: an emerging clinical problem with implications for the future therapeutic scenario. *Future Oncol*. 2012 Dec; 8(12): 1585-95. doi: 10.2217/fon.12.156

Chang YW, Marlin JW, Chance TW, Jakobi R. RhoA mediates cyclooxygenase-2 signaling to disrupt the formation of adherens junctions and increase cell motility. *Cancer Res*. 2006 Dec; 66(24):11700-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1818

Chang HH, Meuillet EJ. Identification and development of mPGES-1 inhibitors: where we are at? *Future Med Chem.* 2011 Nov; 3(15): 1909-34. doi: 104155/fmc.11.136.

Cheng H, Zhang M, Moeckel GW, Zhao Y, Wang S, Qi Z, Breyer MD, Harris RC. Expression of mediators of renal injury in the remnant kidney of ROP mice is attenuated by cyclooxygenase-2 inhibition. *Nephron Exp Nephrol.* 2005; 101 (3): e75-85. doi: 10.1159/000086645. Epub 2005 Jun 30.

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. doi: 10.1016/j.nbd.2009.09.015. Epub 2009 Oct 3.

Choi HJ, Lee DH, Park SH, Kim J, Do KH, An TJ, Ahn YS, Park CB, Moon Y. Induction of human microsomal prostaglandin E synthase 1 by activated oncogene RhoA GTPase in A549 human epithelial cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Sep; 413(3): 448-53. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.116. Epub 2011 Aug 30.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr; 162 (1):156-159.

Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, Merriman B, Nelson SF. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genetics.* 2010 Jan; 6 (1): e1000832. doi: 10.1371/journal.pgen.1000832.

Colin C, Baeza N, Bartoli C, Fina F, Eudes N, Nanni I, Martin PM, Ouafik L, Figarella-Branger D. Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using suppression subtractive hybridization. *Oncogene.* 2006 May; 25(19): 2818-26. doi: 10.1038/sj.onc.1209305.

Colman H, Zhang L, Sulman EP, McDonald JM, Shooshtari NL, Rivera A, Popoff S, Nutt CL, Louis DN, Cairncross JG, Gilbert MR, Phillips HS, Mehta MP, Chakravarti A, Pelloski CE, Bhat K, Feuerstein BG, Jenkins RB, Aldape K. A multigene predictor of outcome in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2010 Jan; 12(1): 49-57. doi: 10.1093/neuonc/nop007. Epub 2009 Oct 20.

Coniglio SJ, Segall JE. Review: molecular mechanism of microglia stimulated glioblastoma invasion. *Matrix Biol.* 2013 Oct-Nov; 32(7-8): 372-80. doi: 10.1016/j.matbio.2013.07.008. Epub 2013 Aug 7.

Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature Rev Neurosci.* 2014 Jul; 15(7): 455-65. doi: 10.1038/nrn3765

Cunha, AS. Análise do papel da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e da expressão das enzimas COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular

e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Cunha MLVD, Maldaun MVC. Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras.* 2019 Mar; 65(3): 424-433. doi: 10.1590/1806-9282.65.3.424. Epub 2019 Apr 11.

Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN, Dey SK. Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Res.* 2005 May; 65(9): 3735-44. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3814

Davies NM, Good RL, Roupe KA, Yáñez JA. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error? Not as easy as 1,2,3. *J Pharm Pharm Sci.* 2004 Jul; 7(2): 217-226.

Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol.* 2016 Nov; 18(11): 1062-1071. Epub 2016 Mar 10.

De Luca C, Papa M. Looking Inside the Matrix: Perineuronal Nets in Plasticity, Maladaptive Plasticity and Neurological Disorders. *Neurochem Res.* 2016 Jul; 41(7): 1507-15. doi: 10.1007/s11064-016-1876-2. Epub 2016 Mar 2.

Deiningner MH, Weller M, Streffer J, Mittelbronn M, Meyermann R. Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. *Acta Neuropathol.* 1999 Sep; 98(3): 240-4. doi:10.1007/s004010051075

Dinchuk JE, Liu RQ, Trzaskos JM. COX-3: in the wrong frame in mind. *Immunol Lett.* 2003 Mar; 86(1): 121. doi: 10.1016/s0165-2478(02)00268-7

Dong JM, Leung T, Manser E, Lim L. cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J Biol Chem.* 1988 Aug; 273 (35): 22554-62. doi: 10.1074/jbc.273.35.22554

Donnini S, Finetti F, Terzuoli E, Giachetti A, Iñiguez MA, Hanaka H, Fresno M, Radmark O, Ziche M. EGFR signaling upregulates expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in cancer cells leading to enhanced tumorigenicity. *Oncogene.* 2012 Jul; 31(29): 3457-66. doi: 10.1038/oncl.2011.503. Epub 2011 Nov 14.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1988 Sep; 12(12): 1062-73.

Durbeej, M. Laminis. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan; 339(1): 259-68. doi: 10.1007/s00441-009-0838-2. Epub 2009 Aug 20.

Ensign FSP, Mathews IT, Symons MH, Berens ME, Tran NL. Implications of Rho GTPases Signaling in Glioma Cell Invasion and Tumor Progression. *Front Oncol*. 2013 Oct; 3:241. doi: 10.3389/fonc.2013.00241.

Eyden B, Tzaphlidou M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. *Micron*. 2001 Apr; 32(3): 287-300. doi: 10.1016/S0968-4328(00)00045-7

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. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Ferreira MT, Gomes RN, Panagopoulos AT, de Almeida FG, Veiga JCE, Colquhoun A. Opposing roles of PGD₂ in GBM. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2018 Jan;134:66-76. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2017.10.002. Epub 2017 Oct 16.

Finetti F, Terzuoli E, Bocci E, Coletta I, Polenzani L, Mangano G, Alisi MA, Cazzolla N, Giachetti A, Ziche M, Donnini S. Pharmacological inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 suppresses epidermal growth factor receptor-mediated tumor growth and angiogenesis. *PLoS One*. 2012; 7(7):e40576. doi: 10.1371/journal.pone.0040576. Epub 2012 Jul 18.

Gerozissis K, De Saint Hilaire Z, Orosco M, Rouch C, Nicolaidis S. Changes in hypothalamic prostaglandin E2 may predict the occurrence of sleep or wakefulness as assessed by parallel EEG and microdialysis in the rat. *Brain Res*. 1995 Aug; 689(2): 239-44. doi: 10.1016/0006-8993(95)00583-c

Giese A, Rief MD, Loo MA, Berens ME. Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Res*. 1994 Jul; 54(14): 3897-904.

Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*. 1996 Aug; 39(2): 235-50. doi: 10.1097/00006123-199608000-00001

Gladson CL, Cheresh DA. Glioblastoma Expression of Vitronectin and the $\alpha v/\beta 3$ Integrin. Adhesion Mechanism for Transformed Glial Cells. *J Clin Invest*. 1991 Dec; 88(6): 1924-1932. doi: 10.1172/JCI115516

Glenn HL, Jacobson BS. Cyclooxygenase and cAMP-dependent protein kinase reorganize the actin cytoskeleton for motility in HeLa cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2003 Aug; 55(4): 265-77. doi: 10.1002/cm.10128

Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC. ECM-mediated glioma cell invasion. *Microsc Res Tech*. 1998 Nov; 43(3): 250-7. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19981101)43:3<250::AID-JEMT7>3.0.CO;2-C

Gomes, RN. Análise do perfil dos prostanoídes 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.

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;11:171-182. doi:10.1186/1476-511X-11-171.

Gong J, Wang ZX, Liu ZY. miRNA-1271 inhibits cell proliferation in neuroglioma by targeting fibronectin 1. *Mol Med Rep.* 2017 Jul; 16(1): 143-150. doi: 10.3892/mmr.2017.6610. Epub 2017 May 19.

Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest.* 2006 Jan; 116 (1): 4-15. doi: 10.1172/JCI27291

Guillamo JS, Lisovoski F, Christov C, Le Guérinel C, Defer GL, Peschanski M, Lefrançois T. Migration pathways of human glioblastoma cells xenografted into the immunosuppressed rat brain. *J Neuroonc.* 2001 May; 52(3): 205-15. doi: 10.1023/a:1010620420241

Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem.* 1997 Aug; 272(33): 20384-8. doi: 10.1074/jbc.272.33.20384

Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2018 Sep; 18(9): 533-548. doi: 10.1038/s41568-018-0038-z.

Hanif-Ur-Rehman, Freitas TE, Gomes RN, Colquhoun A, de Oliveira Silva D. Axially-modified paddlewheel diruthenium (II, III) – ibuprofenato metallodrugs and the influence of the structural modification on U87MG and A172 human glioma cell proliferation, apoptosis, mitosis and migration. *J Inorg Biochem.* 2016 Dec;165:181-191. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.10.003. Epub 2016 Oct 14.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4; 144(5): 646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hanaka H, Pawelzik SC, Johnsen JI, Rakonjac M, Terawaki K, Rasmuson 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; 106(44):18757-62. doi: 10.1073/pnas.0910218106. Epub 2009 Oct 21.

Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract Res Clin Gast.* 2001; 15(5): 801-820. doi: <https://doi.org/10.1053/bega.2001.0236>

Hayaishi O, Matsumura H. Prostaglandins and sleep. *Adv Neuroimmunol.* 1995; 5(2): 211-6. doi: 10.1016/0960-5428(95)00010-y

Hirata E, Yukinaga H, Kamioka Y, Arakawa Y, Miyamoto S, Okada T, Sahai E, Matsuda M. In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *J Cell Sci.* 2012 Feb; 125(Pt4): 858-68. doi: 10.1242/jcs.089995. Epub 2012 Mar 7.

Horwitz AR, Parsons JT. Cell Migration – Movin'on. *Science.* 1999 Nov; 286(5442): 1102-3. doi: 10.1126/science.286.5442.1102

Howe LR, Subbaramaiah K, Kent CV, Zhou XK, Chang SH, Hla T, Jakobsson PJ, Hudis CA, Dannenberg AJ. Genetic deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 suppresses mouse mammary tumor growth and angiogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2013 Oct; 106: 99-105. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2013.04.002. Epub 2013 Apr 25.

Huang X, Taeb S, Jahangiri S, Korpela E, Cadonic I, Yu N, Krylov SN, Fokas E, Boutros PC, Liu SK. miR-620 promotes tumor radioresistance by targeting 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD). *Oncotarget.* 2015 Sep; 6(26): 22439-51

Huber RJ, O'Day DH. Extracellular matrix dynamics and functions in the social amoeba *Dictyostelium*: A critical review. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2017 Jan; 1861(1): 2971-2980. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.09.026. Epub 2016 Sep 28.

Hwang SL, Chang JH, Cheng TS, Sy WD, Lieu AS, Lin CL, Lee KS, Howng SL, Hong YR. Expression of Rac3 in human brain tumors. *J Clin Neurosci.* 2005 Jun; 12(5): 571-4. doi: 10.1016/j.jocn.2004.08.013.

Hsu JY, Chang KY, Chen SH, Lee CT, Chang ST, Cheng HC, Chang WC, Chen BK. Epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 enhances head and neck squamous cell carcinoma metastasis through fibronectin up-regulation. *Oncotarget.* 2015 Jan; 6(3): 1723-39. doi: 10.18632/oncotarget.2783

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estatísticas de câncer no Brasil. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>

Ishibashi M, Bottone FG Jr, Taniura S, Kamitani H, Watanabe T, Eling TE. The cyclooxygenase inhibitor indomethacin modulates gene expression and represses the extracellular matrix protein lamin gamma1 in human glioblastoma cells. *Exp Cell Res.* 2005 Jan 15;302(2):244-52.

Ivanov AI, Romanovsky AA. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci.* 2004 May; 9: 1977-93. doi: 10.2741/1383

Jain AK, Moore SM, Yamaguchi K, Eling TE, Baek SJ. Selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce thymosin beta-4 and alter actin cytoskeletal organization in human colorectal cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Dec; 311(3): 885-91. doi: 10.1124/jpet.104.070664. Epub 2004 Aug 3.

Janssen A, Maier TJ, Schiffmann S, Coste O, Seegel M, Geisslinger G, Grösch S. Evidence of COX-2 independent induction of apoptosis and cell cycle block in human colon carcinoma cells after S- or R-ibuprofen treatment. *Eur J Pharmacol.* 2006 Jul; 540(1-3): 24-33. Epub 2006 May 3. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.04.030

Ji K, Tsirka SE. Inflammation modulates expression of laminin in the central nervous system following ischemic injury. *J Neuroinflammation.* 2012 Jul; 9:159. doi: 10.1186/1742-2094-9-159. doi: 10.1186/1742-2094-9-159

Jiang LW, Wang XF, Wu ZY, Lin PH, Du HP, Wang S, Li LH, Fang N, Zhuo SM, Kang DZ, Chen JX. Label-free detection of fibrillar collagen deposition associated with vascular elements in glioblastoma multiforme by using multiphoton microscopy. *J Microsc.* 2017 Feb; 265(2): 207-213. doi: 10.1111/jmi.12476. Epub 2016 Sep 19.

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; 60(17): 4926-31.

Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, Collins VP. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008 Nov; 68(21): 8673-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2097.

Jongthawin J, Chusorn P, Techasen A, Loilome W, Boonmars T, Thanan R, Puapairoj A, Khuntikeo N, Tassaneeyakul W, Yongvanit P, Namwat N. PGE2 signaling and its biosynthesis-related enzymes in cholangiocarcinoma progression. *Tumour Biol.* 2014 Aug; 35(8):8051-64. doi: 10.1007/s13277-014-2021-y. Epub 2014 May 18.

Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun; 3(6): 422-33. doi: 10.1038/nrc1094

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 tumor growth, invasion and metastasis. *Biochem J.* 2009 Dec; 425(2): 361-71. doi: 10.1042/BJ20090045.

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; 278 (21): 19396-405. doi: 10.1074/jbc.M213290200. Epub 2003 Mar 7.

Kawataki T, Yamane T, Naganuma H, Rousselle P, Andurén I, Tryggvason K, Patarroyo M. Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell migration and invasiveness: Evidence for a role of alpha5-laminin(s) and alpha3beta1 integrin. *Exp Cell Res.* 2007 Nov 1; 313(18): 3819-31. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.07.038. Epub 2007 Aug 16.

Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Aug; 20(8): 457-473. doi: 10.1038/s41580-019-0134-2.

Kim SH, Hashimoto Y, Cho SN, Roszik J, Milton DR, Dal F, Kim SF, Menter DG, Yang P, Ekmekcioglu S, Grimm EA. Microsomal PGE2 synthase-1 regulates melanoma cell survival and associates with melanoma disease progression. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016 May; 29(3):297-308. doi: 10.1111/pcmr.12455. Epub 2016 Mar 15.

Kim SR, Bae MK, Kim JY, Wee HJ, Yoo MA, Bae SK. Aspirin induces apoptosis through the blockade of IL-6-STAT3 signaling pathway in human glioblastoma A172 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Sep; 387(2): 342-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.022. Epub 2009 Jul 10.

Kis B, Snipes JA, Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Oct; 315(1): 1-7. doi: 10.1124/jpet.105.085431. Epub 2005 May 6.

Kock A, Larsson K, Bergqvist F, Eissler N, Elfman LHM, Raouf J, Korotkova M, Johnsen JI, Jakobsson PJ, Kogner P. Inhibition of Microsomal E Synthase-1 in Cancer-Associated Fibroblasts Suppresses Neuroblastoma Tumor Growth. *EBioMedicine.* 2018 Jun; 32: 84-92. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.05.008. Epub 2018 May 24.

Knott JC, Mahesparan R, Garcia-Cabrera I, Bolge Tysnes B, Edvardsen K, Ness Go, Mork S, Lund-Johansen M, Bjerkvig R. Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer.* 1998 Mar; 75(6): 864-72. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19980316)75:6<864::aid-ijc8>3.0.co;2-t

Krishnaswamy VR, Benbenishty A, Blinder P, Sagi I. Demystifying the extracellular matrix and its proteolytic remodeling in the brain: structural and functional insights. *Cel Mol Life Sci.* 2019 Jun; 76: 3229-48. doi: 10.1007/s00018-019-03182-6.

Krysan K, et al. Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor independent manner. *Cancer Res* 2005;65:6275–6281

Kuipers GK, Slotman BJ, Wedekind LE, Stoter TR, Berg Jv, Sminia P, Lafleur MV. Radiosensitization of human glioma cells by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition: independent on COX-2 expression and dependent on the COX-2 inhibitor and sequence of administration. *Int J Radiat Biol.* 2007 Oct;83(10):677-85.

Lampiasi N, Foderà D, D'Alessandro N, Cusimano A, Azzolina A, Tripodo C, Florena AM, Minervini MI, Notarbartolo M, Montalto G, Cervello M. The selective cyclooxygenase-1 inhibitor SC-560 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med.* 2006 Feb; 17(2): 245-52.

Larsson K, Kock A, Idborg H, Henriksson MA, 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 USA*. 2015 Jun; 112(26): 8070-8075. doi: 10.1073/pnas.1424355112

Lal A, Lash AE, Altschul SF, Velculescu V, Zhang L, McLendon RE, Marra MA, Prange C, Morin PJ, Polyak K, Papadopoulos N, Vogelstein B, Zinzler KW, Strausberg RL, Riggins GJ. A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res*. 1999 Nov; 59(21): 5403-7.

Leaver HA, Bell HS, Rizzo MT, Ironside JW, Gregor A, Wharton SB, Whittle IR. Antitumour and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002 Jan; 66(1): 19-29. Doi: <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0336>

Leidgens V, Seliger C, Jachnik B, Welz T, Leukel P, Vollmann-Zwerenz A, Bogdahn U, Kreutz M, Grauer OM, Hau P. Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. *PLoS One*. 2015 Oct; 10(10):e0140613. doi: 10.1371/journal.pone.0140613. eCollection 2015.

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; 30:27. doi: 10.1186/1756-9966-30-27.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec; 25(4):402-8. doi 10.1006/meth.2001.1262.

Ljubimova JY, Fujita M, Khazenzon NM, Ljubimov AV, Black KL. Changes in laminin isoforms associated with brain tumor invasion and angiogenesis. *Front Biosci*. 2006 Jan; 11: 81-8. doi: 10.2741/1781.

Ljubimova JY, Lakhter AJ, Loksh A, Yong WH, Riedinger MS, Miner JH, Sorokin LM, Ljubimov AV, Black KL. Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. *Cancer Res*. 2001 Jul; 61(14): 5601-10.

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): 97-120. doi 10.1007/s00401-007-0243-4. Epub 2007 Jul 6.

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. doi 10.1007/s00401-016-1545-1. Epub 2016 May 9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov; 193 (1): 265–75.

Lu D, Han C, Wu T. Microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibits PTEN and promotes experimental cholangiocarcinogenesis and tumor progression. *Gastroenterology*. 2011 Jun;140(7): 2084-94. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.056. Epub 2011 Feb 24.

Mahesparan R, Tysnes BB, Edvardsen K, Haugeland HK, Cabrera IG, Lund-Johansen M, Engebraaten O, Bjerkvig R. Role of high molecular weight extracellular matrix proteins in glioma cell migration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997 Apr; 23(2): 102-12.

Mak M, Spill F, Kamm RD, Zaman MH. Single-Cell Migration in Complex Microenvironments: Mechanics and Signaling Dynamics. *J Biomech Eng*. 2016 Feb; 138(2): 021004. doi:10.1115/1.4032188.

Maltseva DV, Rodin SA. Laminins in Metastatic Cancer. *Mol Biol*. 2018 Apr; 52(3): 350-371. doi: 10.1134/s0026893318030093.

Malchinkhuu E, Sato K, Maehama T, Mogi C, Tomura H, Ishiuchi S, Yoshimoto Y, Kurose H, Okajima F. S1P(2) receptors mediate inhibition of glioma cell migration through Rho signaling pathways independent of PTEN. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Feb; 366(4): 963-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.054. Epub 2007 Dec 26.

Massoumi R, Nielsen CK, Azemovic D, Sjolander A. Leukotriene D4-induced adhesion of Caco-2 cells is mediated by prostaglandin E2 and upregulation of alpha2beta1-integrin. *Exp Cell Res*. 2003 Oct; 289(2): 342-51.

Malric L, Monferran S, Guilhodes J, Boyrie S, Dahan P, Skuli N, Sesen J, Filleron T, Kowalski-Chauvel A, Moyal ECJ, Toulas C, Lemarié A. Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. *Oncotarget*. 2017 Oct; 8(49): 86947-86968. doi: 10.18632/oncotarget.20372.

Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*. 2004 Oct; 20(15): 2471-2. Epub 2004 Apr 8.

Mattila S, Tuominen H, Koivukangas J, Stenbäck F. The terminal prostaglandin synthases mPGES1, mPGES2, and cPGES are all overexpressed in human gliomas. *Neuropathology*. 2009 Apr; 29(2): 156-65. doi: 10.1111/j.1440-1789.2008.00963.x

Matsuo M, Yoshida N, Zaitzu M, Ishii K, Hamasaki Y. Inhibition of human glioma cell growth by a PHS-2 inhibitor NS398, and a prostaglandin E receptor subtype EP1 – selective antagonist, SC51089. *J Neurooncol*. 2004 Feb; 66(3): 285-92.

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. doi 10.1215/S115285170400050X

Mohan S, Ahmad AS, Glushakov AV, Chambers C, Doré S. Putative role of prostaglandin receptor in intracerebral hemorrhage. *Front Neurol*. 2012 Oct; 3:145. doi: 10.3389/fneur.2012.00145.eCollection 2012.

Monjazez AM, High KP, Koumenis C, Chilton FH. Inhibitors of arachidonic acid metabolism act synergistically to signal apoptosis in neoplastic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Dec; 73(6): 463-74. Epub 2005 Sep 16. doi:10.1016/j.plefa.2005.07.009

New P. Cyclooxygenase in the treatment of glioma: its complex role in signal transduction. *Cancer Control*. 2004 May-Jun; 11(3): 152-64. doi: 10.1177/107327480401100303

Nobes CD, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995 Apr; 81(1): 53-62. doi: 10.1016/0092-8674(95)90370-4

Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Feb; 19(4): 764-72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002. Epub 2012 Dec 3.

Oliver L, Olivier C, François MV. Prostaglandin E2 plays a major role in glioma resistance and progression. *Translational Cancer Research*. 2016 Nov; 5(6). doi: 10.21037/tcr.2016.11.20

Panagopoulos AT, Gomes RN, Almeida FG, Souza FC, Veiga JCE, Nicolaou A, Colquhoun A. The prostanoid pathway contains potential prognostic markers for glioblastoma. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2018 Jul; 137: 52-62. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2018.06.003. Epub 2018 Jun 30.

Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Science*. 2002 Oct; 115: 3861-3863. doi: 10.1242/jcs.00059

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.

Pencheva N, de Gooijer MC, Vis DJ, Wessels LFA, Würdinger T, van Tellingen O, Bernards R. Identification of a Druggable Pathway Controlling Glioblastoma Invasiveness. *Cell Rep*. 2017 Jul; 20(1): 48-60. doi 10.1016/j.celrep.2017.06.036.

Peppelenbosch MP, Tertoolen LG, Hage WJ, de Laat SW. Epidermal growth factor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products. *Cell*. 1993 Aug; 74(3): 565-75.

Pereira ALA, Veras SSL, Silveira EJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB, Freitas RA. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteínas em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. *Rev. Bras.*

Otorrinolaringol. 2005 Jan/Feb; 71(1): 81-6. doi: 10.1590/S0034-72992005000100014

Pokorná E, Jordan PW, O'Neill CH, Zicha D, Gilbert CS, Veselý P. Actin cytoskeleton and motility in rat sarcoma cell populations with different metastatic potential. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1994; 28(1): 25-33. doi: 10.1002/cm.970280103

Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003 Feb; 112 (4): 453-65. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00120-x

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. doi: 10.1053/adpa.2002.33900

Qin Y, Rodin S, Simonson OE, Hollande F. Laminis and cancer stem cells: Partners in crime? *Semin Cancer Biol*. 2017 Aug; 45: 3-12. doi: 10.1016/j.semcancer.2016.07.004. Epub 2016 Aug 1.

Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*. 2004 Jan; 265(1): 23-32. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.06.003

Rall JM, Mach SA, Dash PK. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain Res*. 2003 Apr; 968(2): 273-6. doi: 10.1016/s0006-8993(03)02248-0

Ramis G, Thomàs-Moyà E, Fernández SM, Rodriguez J, Villalonga P. EGFR inhibition in glioma cells modulates Rho signaling to inhibit cell motility and invasion and cooperates with temozolomide to reduce cell growth. *PLoS One*. 2012; 7(6): e38770. doi: 10.1371/journal.pone.0038770. Epub 2012 Jun 6.

Ramos, KL. Comparative analysis of the spatial distribution of molecules related to migration and invasion in a rat brain tumor *in vivo*. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. Rapid cycle real-time PCR, methods and applications. Springer Press 2011. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3

Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, Cloughesy TF, O'Neill A, Plotkin S, Glantz M, Ravin P, Raizer JJ, Rich KM, Schiff D, Shapiro WR, Burdette-Radoux S, Dropcho EJ, Wittemer SM, Nippgen J, Picard M, Nabors LB. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2008 Dec; 26(34): 5610-7. doi: 10.1200/JCO.2008.16.7510. Epub 2008 Nov 3.

Roos A, Ding Z, Loftus JC, Tran NL. Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and Invasion. *Front Oncol*. 2017 Jun; 7:120. doi: 10.3389/fonc.2017.00120. eCollection 2017.

Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res.* 2009 Apr; 50 Suppl: S29-34. doi: 10.1194/jlr.R800042-JLR200.

Ruan D, So SP. Prostaglandin E2 produced by inducible COX-2 and mPGES-1 promoting cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Life Sci.* 2014 Oct; 116(1):43-50. doi: 10.1016/j.lfs.2014.07.042. Epub 2014 Aug 17.

Salhia B, Tran NL, Chan A, Wolf A, Nakada M, Rutka F, Ennis M, McDonough WS, Berens ME, Symons M, Rutka JT. The guanine nucleotide exchange factors trio, Ect2, and Vav3 mediate the invasive behavior of glioblastoma. *Am J Pathol.* 2008 Dec; 173(6): 1828-38. doi: 10.2353/ajpath.2008.080043. Epub 2008 Nov 13.

Sampson CJ, Valanne S, Fauvarque MO, Hulmark D, Ramet M, Williams MJ. The RhoGEF Zizimin-related acts in the Drosophila cellular immune response via the Rho GTPases Rac2 and Cdc42. *Dev Comp Immunol.* 2012 Sep; 38 (1): 160-8. doi: 10.1016/j.dci.2012.05.004. Epub 2012 May 23.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004 Sep; 56(3): 387-437. doi: 10.1124/pr.56.3.3

Schavartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 May; 31(5): 539-44. doi:10.1016/s1357-2725(99)00005-9

Seo MJ, Oh DK. Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. *Prog Lipid Res.* 2017 Apr; 66: 50-68. doi: 10.1016/j.plipres.2017.04.003. Epub 2017 Apr 7.

Senger DL, Tudan C, Guiot MC, Mazzoni IE, Mazzoni IE, Molenkamp G, LeBlanc R, Antel J, Olivier A, Snipes GJ, Kaplan DR. Suppression of Rac activity induces apoptosis of human glioma cells but not normal human astrocytes. *Cancer Res.* 2002 Apr; 62(7): 2131-40.

Serachi, FO. Análise do efeito das ciclooxygenases na expressão e atividade de proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR e MRPs) em glioma humano. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Serezani CH, Kane S, Medeiros AI, Cornett AM, Kim SH, Marques MM, Lee SP, Lewis C, Bourdonnay E, Ballinger MN, White ES, Peters-Golden M. PTEN directly activates the actin depolymerization factor cofilin-1 during PGE2-mediated inhibition of phagocytosis of fungi. *Sci Signal.* 2012 Feb; 5(210): ra12. doi: 10.1126/scisignal.2002448.

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; 61(11): 4375-81.

Sminia P, Stoter TR, van der Valk P, Elkhuizen PH, Tadema TM, Kuipers GK, Vandertop WP, Lafleur MV, Slotman BJ. Expression of cyclooxygenase-2 and

epidermal growth factor receptor in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005 Oct; 131 (10): 653-61. doi:10.1007/s00432-005-0020-5. Epub 2005 Oct 20.

Sousa JF, Di Cristofaro LF, Serafim RB, Netto RP, Souza FO, Soares, CP, Valente V. A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de DNA. *Revista de Ciências Farmacêuticas Aplicadas*. 2015; 36 (2): 213–18.

Souza, FC. Eicosanoides como novos alvos terapeuticos no tratamento de glioblastoma humano. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Stevanatto, PB. Análise do papel das ciclooxigenases 1 e 2 na migração da linhagem celular de glioma humano U251-MG. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Stupp R, Reni M, Gatta G, Mazza E, Vecht C. Anaplastic astrocytoma in adults. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2007; 63(1): 72-80. doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.03.003

Svensmark JH, Brakebusch C. Rho GTPases in cancer: friend or foe? *Oncogene*. 2019 Dec; 38(50): 7447-7456. doi: 10.1038/s41388-019-0963-7. Epub 2019 Aug 19.

Tafani M, Di Vito M, Frati A, Pellegrini L, De Santis E, Sette G, Eramo A, Sale P, Mari E, Santoro A, Raco A, Salvati M, De Maria R, Russo MA. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *J Neuroinflammation*. 2011 Apr; 8:32. doi: 10.1186/1742-2094-8-32.

Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res*. 1999 Jan; 59(2): 442-9.

Tang J, Xiao W, Li Q, Deng Q, Chu X, Chen Y, Pan D, Fu J. A cyclooxygenase-2 inhibitor reduces vascular wall thickness and ameliorates cognitive impairment in a cerebral small vessel diseases rat model. *Curr Alzheimer Res*. 2015; 12(7): 704-10. doi: 10.2174/1567205012666150710104924

Teather LA, Packard MG, Bazan NG. Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. *Learn Mem*. 2002 Jan-Feb; 9(): 41-7. doi: 10.1101/lm.43602

Terzuoli E, Costanza F, Ciccone V, Ziche M, Morbidelli L, Donnini S. mPGES-1 as a new target to overcome acquired resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2019 Aug; 143: 106344. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2019.106344. Epub 2019 Jun 15.

Tran NL, McDonough WS, Savitch BA, Fortin SP, Winkles JA, Symons M, Nakada M, Cunliffe HE, Hostetter G, Hoelzinger DB, Rennert JL, Michaelson JS, Burkly LC,

Lipinski CA, Loftus JC, Mariani L, Berens ME. Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor-kappaB and correlate with poor patient outcome. *Cancer Res.* 2006 Oct; 66(19): 9535-42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0418

Toscano CD, Prabhu VV, Langenbach R, Becker KG, Bosetti F. Differential gene expression patterns in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 deficient mouse brain. *Genome Biol.* 2007; 8(1): R14. doi: 10.1186/gb-2007-8-1-r14.

Tysnes BB, Mahesparan R, Thorsen F, Haugland HK, Porwol T, Enger PO, Lund-Johansen M, Bjerkvig R. Laminin expression by glial fibrillary acidic protein positive cells in human gliomas. *Int J Dev Neurosci.* 1999 Aug-Oct; 17(5-6): 531-9. doi: 10.1016/s0736-5748(99)00055-6

Uhm JH, Dooley NP, Kyritsis AP, Rao JS, Gladson CL. Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death. *Clin Cancer Res.* 1999 Jun; 5(6): 1587-94.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998; 38: 97-120. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97

Vehlow A, Cordes N. Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec; 1836(2): 236-44. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.07.001. Epub 2013 Jul 25.

Venstrom KA, Reichardt LF. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J.* 1993 Aug; 7(11): 996-1003. doi 10.1096/fasebj.7.11.8370483

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahan A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010 Jan; 17(1): 98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.

Walker MP, Zhang M, Le TP, Wu P, Lainé M, Greene GL. Rac3 is a pro-migratory co-activator of ER α . *Oncogene.* 2011 Apr; 30(17): 1984-94. doi: 10.1038/onc.2010.583. Epub 2011 Jan 10.

Wang D, Buchanan FG, Wang H, Dey SK, DuBois RN. Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Res* 2005; 65:1822–1829

Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec; 26(3-4): 525-34.

Wang SD, Rath P, Lal B, Richard JP, Li Y, Goodwin CR, Laterra J, Xia S. EphB2 receptor controls proliferation/migration dichotomy of glioblastoma by interacting with focal adhesion kinase. *Oncogene*. 2012 Dec; 31(50): 5132-43. doi: 10.1038/onc.2012.16. Epub 2012 Feb 6.

Wang X, Baek SJ, Eling T. COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention? *Cancer Metastasis Rev*. 2011 Dec; 30(3-4): 641-57. doi: 10.1007/s10555-011-9301-4.

Wang Z. Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor by G protein-coupled receptors: recent progress, challenges and future research. *Int J Mol Sci*. 2016 Jan; 17(1). doi: 10.3390/ijms17010095.

Watanabe T, Nakamura M, Kros JM, Burkhard C, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Phenotype versus genotype correlation in oligodendrogliomas and low-grade diffuse astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 2002 Mar; 103(3): 267-75. Epub 2001 Nov 22. doi: 10.1007/s004010100464.

Wen PY, Huse JT. 2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2017 Dec; 23 (6, Neuro-oncology):1531-1547. doi: 10.1212/CON.0000000000000536.

Wu H, Li J, Xu D, Jv D, Meng X, Qiao P, Cui T, Shi B. The 37-kDa laminin receptor precursor regulates the malignancy of human glioma cells. *Cell Biochem Funct*. 2016 Oct; 34 (7): 516-521. doi: 10.1002/cbf.3225.

Xu J, Mosher DF (2017). Chapter 2 Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins.

Yap L, Tay HG, Nguyen MTX, Tjin MS, Tryggvason K. Laminins in Cellular Differentiation. *Trends Cell Biol*. 2019 Dec; 29(12): 987-1000. doi: 10.1016/j.tcb.2019.10.001. Epub 2019 Nov 5.

Yang C, Sorokin A. Upregulation of fibronectin expression by COX-2 is mediated by interaction with ELMO1. *Cell Signal*. 2011 Jan; 23(1):99-104. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.08.008. Epub 2010 Aug 21.

Yi Y, Hsieh IY, Huang X, Li J, Zhao W. Glioblastoma Stem-Like Cells: characteristics, microenvironment, and therapy. *Front Pharmacol*. 2016 Dec; 7: 477. doi: 10.3389/fphar.2016.00477. Epub 2016 Dec 7.

Zhou J, et al. Interactions between prostaglandin E2, liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:657–663.