

JANAÍNA ALESSANDRA SILVA

INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS NO TRATAMENTO
QUIMIOTERÁPICO DE GLIOBLASTOMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa Dra Alison Colquhoun

Versão corrigida

SÃO PAULO

2021

RESUMO

Silva, JA. Influência dos ácidos graxos poli-insaturados no tratamento quimioterápico de glioblastoma. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. Instituto de Ciências Biomédicas; Universidade de São Paulo, 2021.

Introdução. As atuais estratégias terapêuticas para o glioblastoma (GBM) são muitas vezes ineficazes e isto acontece principalmente devido ao aumento da atividade das proteínas de resistência (MRPs) e genes de reparo de DNA como o *MGMT*. O ácido eicosapentaenoico (EPA), o ácido docosahexaenoico (DHA) e o ácido gama-linolenico (GLA) podem modular estes mecanismos. **Objetivos.** Avaliar o papel dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) em células resistentes e não resistentes aos quimioterápicos Vincristina (VCR) e Temozolomida (TMZ)., verificando os efeitos sobre o crescimento tumoral, incorporação dos lipídeos bem como atividade das proteínas resistentes. **Metodologia.** As linhagens celulares resistentes derivadas de U87MG foram produzidas com VCR 0,4 nM e TMZ25 µM. Linhagens resistentes de T98G foram produzidas com 5nM de VCR e 112,5 µM de TMZ. Foram realizados ensaios de número de células utilizando DHA, GLA e EPA em células U87MG, TMZ resistentes (TMZ-R) e VCR (VCR-R). A incorporação, atividade das proteínas de resistência e expressão gênica de transportadores ABC foram avaliadas em células após os tratamentos com PUFAs, através do ensaio GCMS, Rodamina 123 e RT-qPCR, respectivamente. Para a análise estatística foram utilizadas ANOVA com Tukey post test ou t-test. **Resultados.** Células U87MG resistentes apresentam aumento da expressão de *MGMT*. Em células U87MG, o tratamento VCR + EPA [100 µM] diminuiu o número de células, assim como em células VCR-R. As células parecem ter uma diminuição da atividade de efluxo após os tratamentos. Os genes *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC3* e *ABCC4* tiveram sua expressão alterada após os tratamentos. **Conclusão.** Cada combinação entre ácidos graxos e quimioterápicos teve uma característica bastante específica, corroborando com questões encontradas na literatura para outros tipos de câncer. Estudos sobre a influência de ácidos graxos poli-insaturados em GBM são escassos e a partir da relevância dos dados encontrados mais estudos devem ser feitos para verificar a atuação desses lipídeos no tumor cerebral mais incidente no sistema nervoso central.

Palavras-chave: Câncer. Glioblastoma. EPA. DHA. GLA. Ácidos graxos poli-insaturados. Resistência à múltiplas drogas. Quimioterapia.

ABSTRACT

Silva, JA. Influence of Polyunsaturated fatty acids in chemotherapeutic treatment of glioblastoma. [Ph.D. Thesis (Cell and Tissue Biology)]. Biomedical Science Institute; University of São Paulo, 2021.

Background. Current therapeutic strategies for glioblastoma (GBM) are often ineffective and this is mainly due to increased activity of multidrug-resistant proteins (MRPs) and DNA gene repair such as *MGMT*. Eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and gamma-linolenic acid (GLA) can modulate these mechanisms. **Aims.** To evaluate the role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in drug resistance of human GBM cells by checking the effects on tumor growth, incorporation and chemotherapeutic action of Vincristine (VCR) and Temozolomide (TMZ). **Methodology.** Drug-resistant U87MG-derived cell lines were grown with VCR 0.4 nM and TMZ 25 µM. Resistant T98G cell lines were produced with VCR 5nM and 112.5 µM TMZ. Cell growth assays were performed using DHA, GLA and EPA in U87MG, TMZ resistant (TMZ-R) and VCR (VCR-R) cells. Incorporation, resistance protein activity and ABC transporter gene expression were evaluated in cells after PUFAs treatments by GCMS assay, Rhodamine 123 and RT-qPCR, respectively. ANOVA with Tukey post test. or t-test were used for statistical analysis to assess statistical significance. **Results.** In U87MG resistant cells *MGMT* gene were increased. In U87MG cells, VCR + EPA [100 µM] decreased cell number. In VCR-R cells, VCR + EPA [100 µM] diminished cell number. The cells appear to have a decrease in efflux activity after the treatments. The genes *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC3* and *ABCC4* had their expression altered in resistant cells. **Conclusion.** Each combination between fatty acids and chemotherapy had a very specific characteristic, corroborating with issues found in the literature, but studies on the influence of polyunsaturated fatty acids in GBM are scarce and from the relevance of the data found, it is important for research that more studies are done

Keywords: Glioblastoma. EPA. DHA. GLA. Polyunsaturated fatty acids. Multiple drug resistance. Chemotherapy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, essas células tendem a ser muito agressivas e de proliferação incontrolável, determinando a formação de tumores que podem se espalhar para outras regiões do corpo (INCA, 2019).

É uma doença que foi relatada há 30 séculos antes de Cristo (a.C), quando egípcios, persas e indianos se referiram a massas sólidas malignas que surgiam no corpo, mas foram de estudos provenientes da escola de Hipócrates, datados do século IV a.C., que a definição da doença foi concretizada, caracterizando-a como um tumor duro que, muitas vezes, reaparecia depois de retirado, ou que se alastrava para diversas partes do corpo, levando o indivíduo à morte. O câncer, então denominado carcinoma ou cirro, era visto pelos hipocráticos como um desequilíbrio dos fluidos que compunham o organismo (Teixeira et al., 2007).

Desde essa data até os dias atuais o câncer é uma doença que desafia a Ciência e a busca por novas terapias, pois assim como descrito, é uma anormalidade que se desenvolve continuamente, causando a proliferação desregrada de células que, em vez de responderem apropriadamente aos sinais que controlam o comportamento celular normal, crescem e dividem-se de uma maneira desorientada, resultando em acumuladas disfunções em múltiplos sistemas reguladores e refletindo, em muitos aspectos, um comportamento celular que as distingue das células normais equivalentes (Hanahan e Weiberg, 2011).

Em 2018, a IARC (International Agency for Research on Cancer) estimou cerca de 18,1 milhões de novos casos de câncer naquele ano e aproximadamente 9,6 milhões de mortes em todo o mundo (Ferlay J., 2019), corroborando para que a doença seja o principal problema de saúde pública atual e uma dentre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países.

No Brasil, de acordo com o INCA, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 é de que ocorrerão cerca de 625 mil novos casos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) (Figura 1). Dentre esses, os estudos apontam que 5870 casos por 100 mil habitantes serão de tumores do Sistema Nervoso Central (Figura 2 e 3).

Fonte: International Agency for Research on Cancer (IARC)

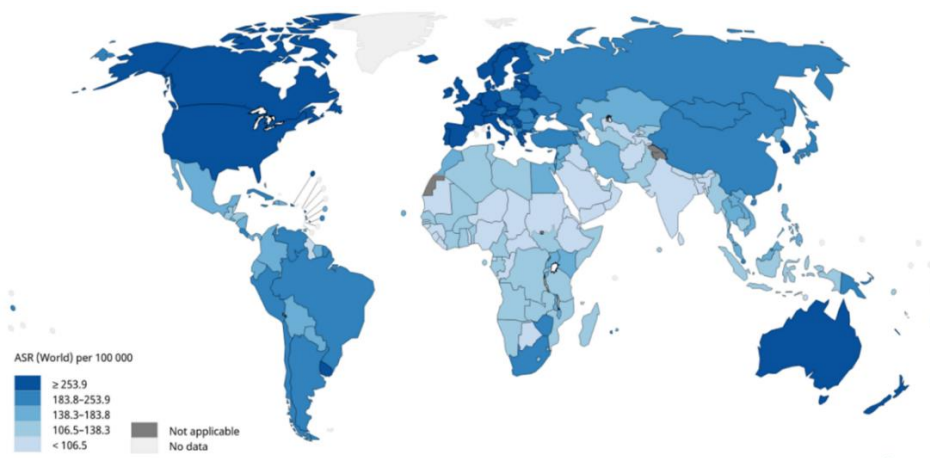


Figura 1. Estimativa de casos de câncer no mundo por 100 000 habitantes pela Organização Mundial da Saúde.

Fonte: International Agency for Research on Cancer (IARC)

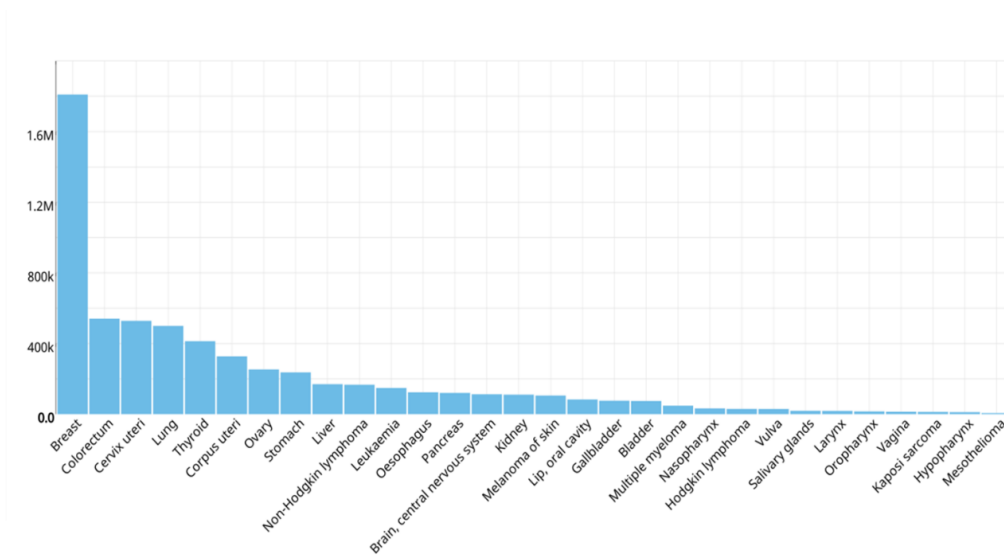


Figura 2. Estimativa de casos de câncer em mulheres de 0 a 74 anos de acordo com a especificidade

Fonte: International Agency for Research on Cancer (IARC)

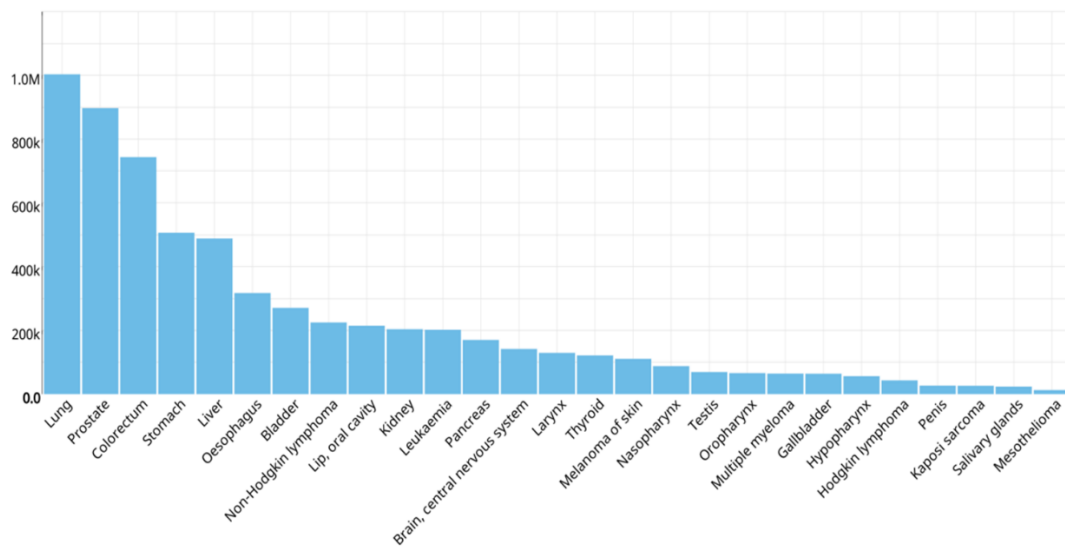


Figura 3. Estimativa de casos de câncer em homens de 0 a 74 anos de acordo com a especificidade

1.2. TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Os tumores do SNC, apesar de representarem cerca de 2 a 3% da prevalência de tumores em humanos em comparação aos outros tipos mais frequentes, tiveram sua incidência aumentada nos últimos anos, principalmente em indivíduos idosos (Maher e McKee, 2003).

Alguns estudos documentaram esse aumento principalmente em países industrializados, porém sem diferenças étnicas, de gênero ou geográficas, sendo baseado em muitos fatores, incluindo melhor capacidade de diagnóstico e melhor acesso aos serviços de saúde (Butowski NA, 2015). Sobre os fatores de risco eminentes, a única associação consistente que resultou de estudos epidemiológicos é correlacionada à radiação ionizante. Outros fatores foram analisados nesse contexto, como condições atópicas (asma e alergias alimentares), radiação de telefone celular, contato com pesticidas e dietas ricas em alimentos ultra processados, mas nenhum deles demonstrou uma ligação significativa com o risco de tumores no SNC (McNeill, 2016).

Os cânceres nessa região afetam tanto crianças quanto adultos e são diagnosticados em todas as regiões anatômicas do SNC, com a grande parte (> 90%) ocorrendo no cérebro e o restante em meninges, coluna vertebral e nervos cranianos (GBD, 2019).

Eram classificados exclusivamente com base nas características histomorfológicas, uma abordagem compatível com as capacidades da maioria dos centros clínicos em todo o mundo até então (Diamandis et al, 2018), mas em 2016

a OMS apresentou uma nova classificação, utilizando parâmetros moleculares além da histologia, complementando a classificação de 2007, para, além de definir muitas entidades tumorais, formular um conceito de como o diagnóstico de tumores deve ser estruturado na era da biologia molecular (Louis et al, 2016).

A tabela a seguir representa a nova classificação proposta pela OMS em comparação à classificação anterior (Diamandis et al, 2018):

Classificação dos principais tumores do SNC em 2016

<u>Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos</u>	Grau		
		Neurocitoma central	II
Astrocitoma difuso, IDH-mutante	II	Neurocitoma extraventricular	II
Astrocitoma anaplásico, IDH-mutante	III	Liponeurocitoma cerebelar	II
Glioblastoma, IDH-selvagem	IV		
Glioblastoma, IDH-mutante	IV	<u>Tumores da região pineal</u>	
Glioma difuso da linha média, H3k27M-mutante	IV	Pineocitoma	I
Oligodendroglioma anaplásico, IDH-mutante e 1p/19q deletado	III	Tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária	II ou III
		Pineoblastoma	IV
<u>Outros tumores astrocíticos</u>		Tumor papilar da região pineal	II ou III
Astrocitoma pilocítico	I		
Astrocitoma subependimário de células gigantes	I	<u>Tumores embrionários</u>	
Xantastrocitoma pleomórfico	II	Meduloblastoma (todos os subtipos)	IV
Xantastrocitoma pleomórfico anaplásico	III	Tumores embrionários com rosetas em multicamadas, C19MC-alterado	IV
		Meduloepitelioma	IV
<u>Tumores ependimais</u>		Tumor embrionário do SNC, NOS	IV
Subependimoma	I	Tumor teratoide/rabdoide atípico	IV
Ependimoma mixopapilar	I	Tumor embrionário do SNC com características rabdoides	IV
Ependimoma, fusão RELA-positiva	II ou III		
Ependimoma anaplásico	III	<u>Tumores dos nervos cranianos e paraespinais</u>	
		Schwannoma	I
<u>Outros gliomas</u>		Neurofibroma	I
Glioma agiocêntrico	I	Perineurioma	I
Glioma cordóide do terceiro ventrículo	II	Tumor maligno de bainha de nervo periférico (TMBNP)	II, III ou IV
<u>Tumores do plexo coroide</u>		<u>Meningiomas</u>	
Papiloma do plexo coroide	I	Meningioma	I
Papiloma do plexo coroide atípico	II	Meningioma atípico	II
Carcinoma do plexo coroide	III	Meningioma anaplásico maligno	III
<u>Tumores neuronais e neuronais-gliais mistos</u>		<u>Tumores mesenquimais não meningiais</u>	
Tumor neuroepitelial disembrionário	I	Tumor fibroso solitário/ Hemangiopericitoma	I, II ou III
Gangliocitoma	I	Hemangioblastoma	I
Ganglioglioma	I		
Ganglioglioma anaplásico	III	<u>Tumores da região selar</u>	
Gangliocitoma displásico do cerebelo (Lhermitte-Duclos)	I	Craniofaringioma	I
Astrocitoma e ganglioglioma desmoplásico infantil	I	Tumor de células granulares	I
Tumor glioneuronal papilar	I	Pituicoma	I
Tumor glioneuronal formador de roseta	I	Oncocitoma de células fusiformes	I

Tabela 1. Classificação dos principais tumores do SNC adaptado de Louis et al (2016).

Dentre os inúmeros tipos de tumores do SNC apresentados, destacam-se os gliomas que representam cerca de 80% dos casos de tumores malignos nessa região (Schuartzbaum et al, 2006).

1.3. GLIOMAS

Os gliomas são os tumores cerebrais originados das células da glia, células que são de grande importância para o SNC para suporte, proteção e nutrição dos neurônios (Jakel e Dimou, 2017). São os tumores primários mais prevalentes no cérebro e medula espinhal e histologicamente, compartilham características gliais semelhantes às células de origem, sendo inclusive nomeados de acordo com a célula glial originária. Os oligodendrogliomas, por exemplo, são originados de oligodendrócitos, enquanto que os ependimomas e os astrocitomas são originados de células ependimárias e astrócitos, respectivamente (Louis et al., 2007).

Na nova classificação de 2016, alterações na expressão de genes supressores de tumor como o p53 e PTEN, além de mutações cromossômicas como a deleção nos cromossomos 1p/19q e mutações em proteínas importantes para o metabolismo celular, como a IDH (isocitrato desidrogenase) tornaram-se relevantes para diagnóstico e avaliação do grau de malignidade tumoral (DeWitt et al., 2017).

A IDH, por exemplo, é uma proteína de molécula pequena que está envolvida diretamente em processos como a fosforilação oxidativa, lipogênese e regulação do sistema redox das células (Mirchia e Richardson, 2020). Está presente em três subtipos, mas dois principais: IDH-1 e IDH-2. A primeira está presente no citoplasma e peroxissomos e possui efeito antioxidante em eucariotos. Já a segunda, está

presente nas mitocôndrias e tem o papel fundamental na regulação do Ciclo do Ácido Cítrico, envolvida principalmente no metabolismo energético (Figuroa et al., 2010).

Segundo Yoon et al (2020), a mutação em IDH foi encontrada em mais de 70% dos gliomas de grau II e III. A mesma mutação é observada em quase todos os glioblastomas secundários que se desenvolvem a partir de gliomas de baixo grau e está associada a um melhor prognóstico tumoral.

As mutações IDH1/2 produzem o ácido 2- hidroxiglurático (2-HG) a partir do Isocitrato. Esse produto favorece o aumento da expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial), promovendo a formação de um microambiente tumoral e aumentando a invasão celular através da expressão de HiF-1 α (fator induzido por hipóxia), porém compromete significativamente o metabolismo de células tronco tumorais, devido a competição promovida entre 2-HG e α -cetoglutarato (Kloosterhof et al., 2011; Huang et al., 2019).

Tumores de grau I são classificados como circunscritos e não apresentam essa mutação; são considerados benignos e curáveis por ressecção completa através de cirurgia (Louis et al., 2016).

Por outro lado, apresentam mutações frequentes em BRAF, uma proteína quinase presente na via de sinalização de MAPK/ERK (Hawkins et al., 2011), importante para o processo transcricional. A BRAF mutante ativa a via de RAS em células tumorais, mas ao mesmo tempo pode causar senescência em células tronco desses tumores, mantendo o câncer menos agressivo (Raabe et al., 2011).

Já os gliomas difusos não são tratados apenas por ressecção cirúrgica e são os tumores intrínsecos mais frequentes no SNC, especialmente em adultos. São classificados histologicamente como astrocitomas difusos, oligodendrogliomas ou neoplasias de fenótipo misto como os oligoastrocitomas. Dentro desses subgrupos e com base na presença ou ausência de atividade mitótica, necrose ou angiogênese, esses tumores são classificados em diferentes graus de malignidade (II, III e IV) (Wesseling e Capper, 2018).

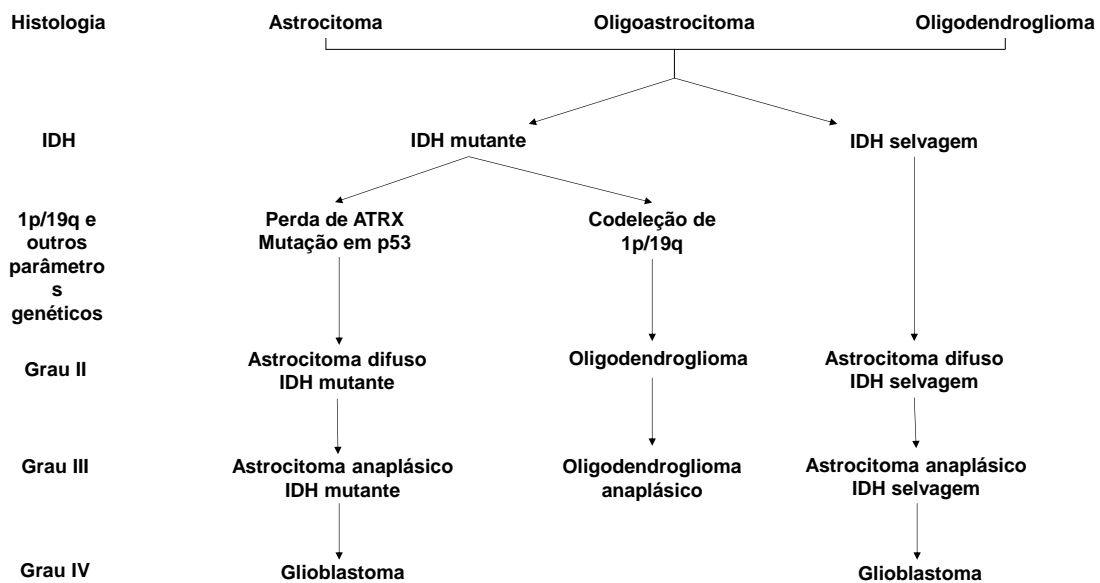


Figura 4. Classificação do tumores cerebrais adaptado de Nandakumar et al. (2017)

1.4. GLIOBLASTOMA

O glioma de grau IV, chamado de glioblastoma (GBM) é o mais maligno de todos os tumores astrocíticos e é caracterizado histopatologicamente por apresentar polimorfismo celular, atipia nuclear, intensa atividade mitótica, trombose vascular, proliferação microvascular e necrose, sendo esses dois últimos pontos os

diferenciais para o diagnóstico dentre os outros tipos tumorais gliais (Kleihues et al., 2002).

Foi identificado pela primeira vez em 1863 pelo médico Rudolf Virchow e era denominado espongioblastoma multiforme. Na década de 1920, Walter Dandy, um médico neurocirurgião, fez a remoção de todo o hemisfério cerebral de dois pacientes que sofriam de GBM, porém os pacientes sucumbiram à doença, fornecendo a primeira evidência do potencial de invasão e agressividade do GBM (Agnihotri et al., 2012).

Segundo Ostrom et al., (2016), os GBMs são os tumores cerebrais malignos primários mais comuns em adultos (46,6% de todos os casos). A maioria se desenvolve como GBM primário, sem evidência prévia de doença, mas uma pequena proporção (5 a 10%) pode se desenvolver a partir de graus mais baixos recorrentes e são conhecidos como GBMs secundários.

De acordo com Cambruzzi (2017), os principais agentes responsáveis pela progressão tumoral em GBMs são as mutações nos genes p53, PTEN, IDH, metilação de *MGMT* (gene de reparo de DNA) e aumento da expressão de EGFR (fator de crescimento epidermal).

O gene p53 codifica uma proteína importante para o controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução de apoptose. Em condições de estresse, a proteína p53 bloqueia o ciclo. A forma mutada é incapaz de controlar a proliferação celular, resultando em um reparo ineficiente (Zhang et al., 2018; Cavalcanti et al., 2002).

Já o EGFR, importante para a progressão do GBM, está superexpresso em aproximadamente 60% desses tumores em caráter primário, e em 10% em secundários (Xu et al., 2017). Esse aumento permite a ativação de vias de sinalização responsáveis pela proliferação, invasão, angiogenese e resistência à apoptose (Eskilsson et al., 2018).

Esses fatores em conjunto contribuem para uma das dificuldades encontradas no tratamento de glioblastoma na clínica, que é a resistência do tumor aos tratamentos já estabelecidos, como radioterapia e quimioterapia. Segundo Zhang et al (2019), múltiplos mecanismos, incluindo superexpressão de proteínas de resistência a drogas, atividade de reparo de DNA aumentada, células-tronco cancerígenas e desregulação da apoptose parecem estar envolvidos no desenvolvimento de resistência a medicamentos nesses tumores.

1.5. QUIMIOTERAPIA E CÂNCER

Segundo Niero et al. (2014), a utilização de agentes químicos para tratar pacientes com câncer se iniciou com dois estudos realizados na década de 1940. Observou-se que após o tratamento com ácido fólico e mostarda de azoto, um derivado do gás mostarda (composto químico utilizado em grandes guerras) o tumor reduzia o seu tamanho. Posteriormente observou-se que após a ressecção e surgimento de novas células neoplásicas, um novo tratamento com os mesmos compostos não fazia efeito algum, conferindo às células a resistência à droga.

Caracterizada como intrínseca - quando as células tumorais exibem resistência à quimioterapia desde a sua primeira exposição a um fármaco – ou

adquirida - quando a resistência à quimioterapia ocorre durante o curso de tratamento na sequência de uma quimioterapia inicialmente bem sucedida – a resistência é um reflexo do resultado de numerosas alterações genéticas e epigenéticas nas células (Niero et al, 2014; Cort e Ozben, 2015).

Os tumores são geralmente constituídos por uma população mista de células malignas; algumas sensíveis à droga, algumas fármaco-resistentes. No decorrer do tratamento, as células podem desenvolver resistência a diversos tipos de medicamentos sendo essa uma das maiores limitações no tratamento dos pacientes (Sodani et al., 2012).

Nas últimas décadas, apesar dos avanços na descoberta de novos quimioterápicos, no caso de pacientes com tumores cerebrais malignos, os resultados ainda são pouco eficazes (Wen e Kesari, 2008). Alguns estudos não apontam impacto significativo dos fármacos sobre a doença e esses resultados podem ser elucidados pela capacidade das células em desenvolverem mecanismos de resistência.

A maioria dos fármacos tem como alvo principal o DNA da célula tumoral, modificando a expressão gênica (Niero et al., 2014). No entanto, o mecanismo de efluxo através de proteínas de membrana resistentes a múltiplas drogas (MRPs), aumentadas através da superexpressão de membros da superfamília de transportadores ABC além da ativação de genes de reparo como o *MGMT*, assumem-se como alguns dos principais responsáveis pelo fenótipo de resistência

em GBM, impedindo a ação da droga no meio intracelular (Kartal et al., 2015; Fantappiè et al., 2002; Wilkens, 2015).

1.6. AGENTES ALQUILANTES DE DNA

Os quimioterápicos mais utilizados para o tratamento do GBM são agentes alquilantes lipofílicos, o que permite a sua passagem pela barreira hematoencefálica (Lee, 2016). A carmustina, lomustina, procarbazina e temozolomida (TMZ), são agentes alquilantes de DNA administrados por via oral ou por via intravenosa para glioblastoma (Skinner et al., 2018).

A TMZ, considerada a principal droga no tratamento desse tumor, não foi inicialmente desenvolvida para esse tipo de câncer, mas atraiu o interesse de pesquisadores após observações em ensaios genéricos de fase I (Azaj et al, 2014). Os resultados obtidos em Stupp et al. (2005) com a droga combinada à radioterapia persistem como o único grande avanço no tratamento de glioblastoma nas últimas décadas.

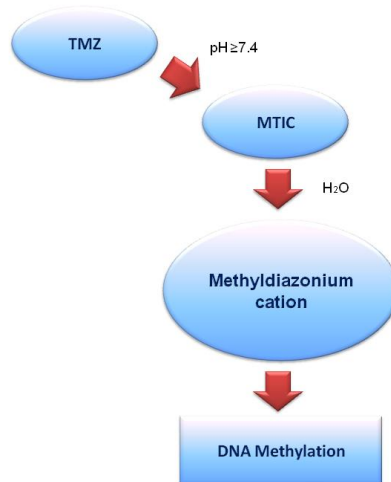


Figura 5. Esquema simplificado de ação do quimioterápico Temozolomida (TMZ).

A TMZ provoca citotoxicidade através de um grupo metil que se liga a guanina nas posições O6 e N7 e adenina na posição N3 durante a replicação do DNA (Zanders et al., 2019). É uma droga estável a um pH menor que 5, mas a um pH superior a 7, é rapidamente hidrolisada a 5- (3- metiltriazem-1-il) imidazol-4-carboxamida (MTIC). O MTIC reage ainda com a água para liberar 5-aminoimidazol-4-carboxamida, o metildiazônio reativo (Figura 5). Estes grupos citotóxicos formados induzem a parada do ciclo celular em G2 / M, eventualmente levando à apoptose celular (Guèrard et al., 2017; Stavroskaya et al., 2016). Esse processo pode ser interrompido pela ação dos genes de reparo de DNA resultando em resistência à terapia (Zanders et al., 2019).

1.7. PRINCIPAIS GENES DE REPARO DE DNA EM GLIOBLASTOMA

A O6-metilguanina metiltransferase (MGMT) é uma enzima de reparo direto da lesão citotóxica gerada pela TMZ (Figura 6), removendo o grupo metil na O6-

metilguanina e levando à invalidação da lesão induzida pela droga no DNA da célula tumoral (Atkins et al., 2015). Aproximadamente 10% das lesões induzidas por TMZ são removidas pela MGMT e numerosos estudos em GBM mostram uma ligação clara entre quimiosensibilidade à TMZ, metilação do promotor MGMT e conteúdo celular da enzima MGMT (Hombach-Klonisch et al., 2018).

Em Kohsaka et al.(2012) observou-se que células de GBM com resistência natural à TMZ expressam níveis mais altos de MGMT do que células de GBM sensíveis à droga. Na tabela apresentada por Bouzinab et al. (2019) essa premissa fica evidente quando se observa a linhagem U373M, que expressa MGMT e a linhagem U373V. A resistência à TMZ é evidenciada na primeira linhagem, enquanto que na segunda, observa-se uma sensibilidade 6 vezes maior ao quimioterápico.

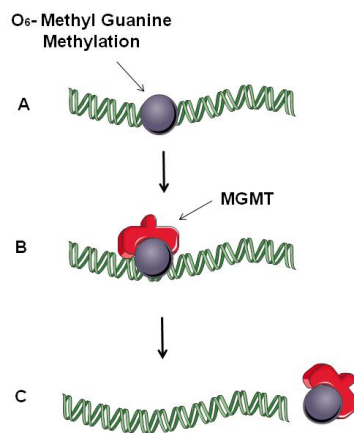


Figura 6. Ação do MGMT no reparo de DNA

Uma alternativa de tratamento para o GBM bastante descrita na literatura é a combinação de drogas, a fim de evitar a ação reparadora. Em Vlachostergios et al. (2013), por exemplo, observou-se a combinação da TMZ com a droga bortezomibe (BTZ), um dipeptídeo que inibe a ação do proteassoma e reduz significativamente os níveis de MGMT. A eficácia da combinação dos quimioterápicos foi diferente em cada linhagem analisada. Em U87MG, que não expressa MGMT, a apoptose foi aumentada quando administrada TMZ. Já em T98G, que expressa MGMT, não houve modificação.

No estudo em fase II de Herrlinger et al. (2019), houve a combinação de TMZ e Lomustina, que tem efeito em ligações cruzadas no DNA. Foi observado que o uso das terapias combinadas aumentou a sobrevida média em pacientes com GBM que apresentavam o promotor MGMT metilado.

Quando a ocorrência desse sistema de reparo falha, a indução de apoptose da célula se faz necessária e acontece através de outro sistema: o sistema de reparo de incompatibilidade (MMR). O MMR (mismatch repair) é um sistema que corrige incompatibilidades de bases nucleotídicas geradas no processo de síntese de DNA. Mutações nesse sistema são raras em GBM primário, porém com a ação da TMZ, o tumor pode se tornar vulnerável, de modo que as células tumorais adquiram resistência devido a inatividade dessa via (Jiapaer et al., 2018).

Em Stritzelberger et al. (2018), os resultados confirmaram que a deficiência em MMR tornou-se um processo crucial para a evolução da resistência à TMZ em linhagens U251 de GBM tanto sensíveis quanto resistentes. Com o uso de

Lomustina, esse processo foi melhorado, sendo que resistentes à TMZ e deficientes em MMR foram particularmente sensíveis à Lomustina e à combinação Lomustina + TMZ.

Assim como *MGMT*, a via MMR age diretamente na posição O6 da guanina; enquanto que o reparo de metilação ocorrida nas posições N3 da adenina e N7 da guanina ocorre através do sistema de reparo por excisão de base (BER). Esse processo é facilmente reparado e representa mais de 90% da metilação causada pela TMZ, porém com menor evidência na literatura que as outras vias anteriores (Jiapaer et al. 2018).

Quando um ou mais componentes de BER são mutados, o resultado já descrito em alguns estudos é a deficiência na capacidade de reparo de danos no DNA, contribuindo para a citotoxicidade à TMZ em GBM. Em Goellner et al. (2011) observou-se que a inibição da via de BER teve um efeito importante na sensibilidade de células com elevada expressão de *MGMT* e deficiência na via MMR para TMZ, contribuindo para morte celular das células tumorais.

Para esse trabalho, optou-se pela observação de *MGMT* apenas, devido à correlação já evidenciada em muitos trabalhos sobre sua resposta em GBMs tratados com TMZ.

1.8. AGENTES INIBIDORES DE CICLO CELULAR

Considerando os alvos terapêuticos utilizados na clínica, além dos agentes alquilantes descritos, destacam-se também os alcaloides de vinca como a

Vincristina (VCR), um quimioterápico clássico para o tratamento de diferentes tipos de tumores sólidos.

É uma droga que tem como alvo principal os microtúbulos das células, alterando a dinâmica desses componentes e causando parada mitótica seguida de apoptose e morte celular em células que se dividem ativamente (Figura 7) (Park et al., 2016). Nos tumores sólidos, contudo, presume-se que a citotoxicidade induzida por essa droga resulte, além da função clássica, na alteração direta das funções não mitóticas dos microtúbulos, como a função estrutural (Rehulka et al., 2017).

A VCR é um dímero extraído da planta pervinca, *Vinca rosea*, que foi disponibilizada para clínica médica em 1961. Sua estrutura química é muito semelhante a da Vinblastina, mas a Vincristina se mostrou mais potente principalmente em neoplasias infantis (Selawry e Hananian, 1963).

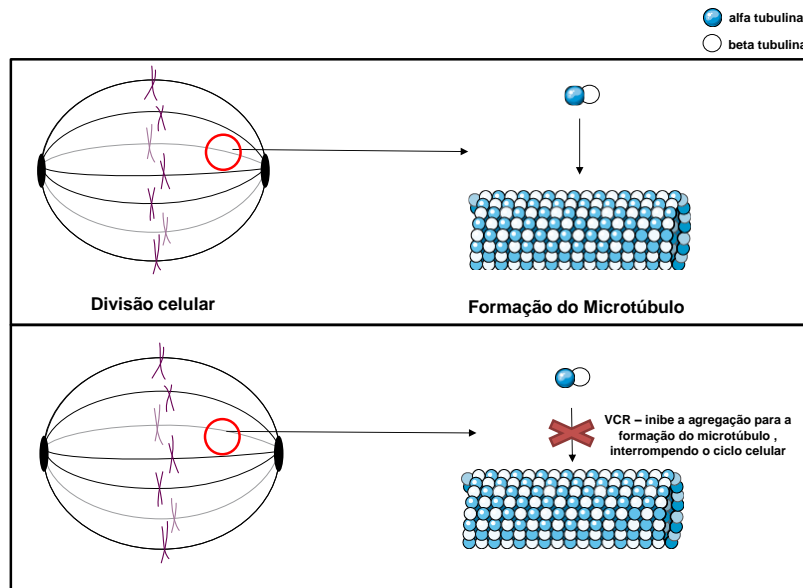


Figura 7. Mecanismo de ação da Vincristina. Adaptado de Starobova H et al. (2017)

Quanto às neoplasias cerebrais, ela foi descrita por Wilson e Hoshino (1969) citando Lassman et al. (1965)., em um estudo de respostas clínicas e *in vitro* como um agente importante no tratamento de GBM em cinco pacientes. Em Avramis et al. (2001) a droga inibiu a secreção de VEGF das células cancerosas e reduziu a formação da rede capilar *in vitro*, além de interromper o ciclo celular.

A Vincristina é utilizada na clínica principalmente em combinação com outros dois quimioterápicos, formando o tratamento PCV, que além de VCR, possui a procarbazina (PRC) e lomustina (CCNU). Esta combinação demonstrou sua eficácia em tratar gliomas de alto grau em inúmeros estudos, principalmente em tumores cerebrais com recidiva (Aydin et al., 2010)

Os mecanismos de resistência adquiridos pelas células tumorais diminuem o efeito da VCR principalmente através da expressão de proteínas de membrana

resistentes à múltiplas drogas (MRPs), que possuem um papel fisiológico importante em condições normais, protegendo o organismo de xenobióticos e toxinas que são transportados do meio intra para o meio extracelular. Em condições adversas, as células tumorais utilizam desse mesmo mecanismo, interrompendo o processo de tratamento e aumentando a resistência tumoral (Shukla et al., 2011).

1.9. TRANSPORTADORES ABC E PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS (MRPs)

O mecanismo de efluxo através de proteínas de membrana resistentes a múltiplas drogas (MRPs) assume-se como um dos principais responsáveis pelo fenótipo de resistência em glioblastoma, impedindo a ação da droga no meio intracelular (Niero et al., 2014; Kartal et al., 2015; Fantappiè et al., 2002). Essas proteínas surgem através do aumento da expressão de membros da superfamília de transportadores ABC.

Essa superfamília, em humanos, é composta por 48 membros distribuídos em sete subfamílias (ABCA a ABCG). Geralmente essas proteínas se localizam na membrana celular, porém foram encontradas em membranas de mitocôndrias, Complexo de Golgi e retículo endoplasmático (Domenichini et al., 2019).

Muitos estudos na literatura demonstram que alguns desses transportadores estão associados a diversas doenças, incluindo fibrose cística, doença de Tangier e câncer (Wilkins, 2015).

Os transportadores ABC são proteínas de membrana que se alocam em domínios transmembranares (TMD – do inglês *TransMembrane Domain*) e

domínios de ligação de nucleotídeos distintos (NBDs – do inglês *Nucleotide Binding Domain*) (Figura 8), que obtém energia a partir da hidrólise de ATP para transportar ativamente uma variedade de compostos através da membrana (Wu et al., 2008), incluindo íons, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídios, hormônios e drogas, bem como moléculas maiores, como oligossacarídeos (Dean et al., 2001).

Em GBMs a super expressão da glicoproteína P (gp-P) codificada pelo gene *ABCB1* (ou MDR1) e sua atividade de efluxo de quimioterápicos é a mais descrita na literatura. A gp-P foi o primeiro membro descoberto da série de transportadores ABC por Smit et al. (1993) e atua como uma barreira fisiológica, ejetando toxinas para o meio extracelular em células distintas, incluindo células epiteliais de revestimento do cólon, intestino delgado, ductos pancreáticos, ductos biliares, túbulos proximais renais e glândula suprarrenal.

Curiosamente, essa proteína é expressa de maneira exorbitante em células neoplásicas (Cort e Ozben, 2015; Guo et al., 2010) e isso sugere que a expressão da gp-P pode ser considerada um marcador de agressividade do tumor, embora o seu mecanismo exato ainda seja desconhecido (Fantappiè et al., 2002).

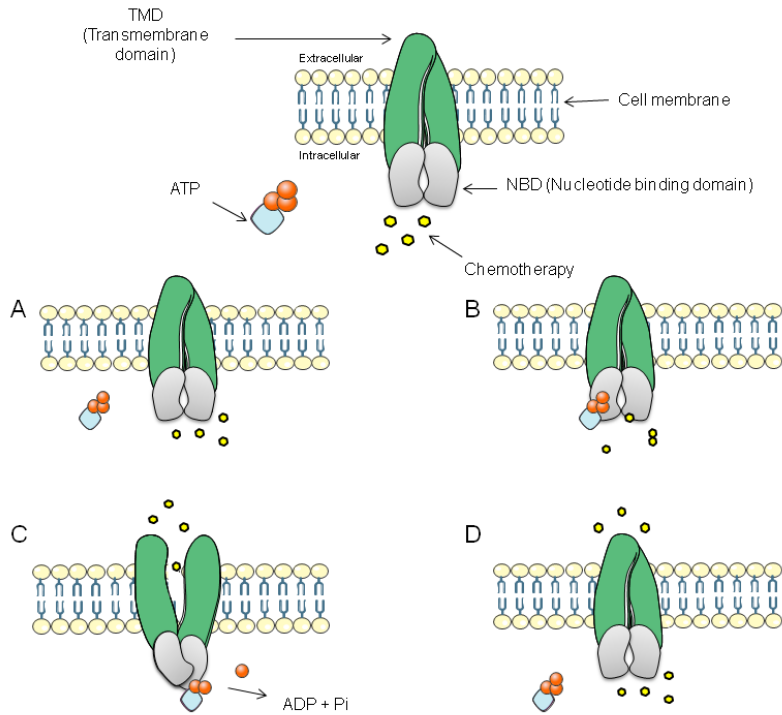


Figura 8. Mecanismo de ação dos transportadores ABC.

Além dessa, outras proteínas como a MRP1, MRP3 e MRP4, traduzidas a partir dos genes *ABCC1*, *ABCC3* e *ABCC4* respectivamente, conferem resistência a uma variedade de quimioterápicos em diferentes tipos de câncer (Zhou et al., 2008).

Em células de glioma observou-se nas linhagens de IN500 e T98G níveis elevados de RNAm dessas MRPs, resistentes para vários agentes quimioterápicos, tais como a VCR (Abe et al., 1995). Já em de Gooijer et al. (2018), observou-se que a eficácia do tratamento com TMZ em modelos *in vivo* knockout para *ABCB1* era maior em comparação ao grupo com a expressão desse gene.

Em Haber et al. (2006) a expressão de MRP1 detectada em 209 pacientes com neuroblastoma primário foi preditiva sobre a sobrevida global dos doentes. Em Munoz et al. (2015) observou-se que o uso de inibidores de gp-P em conjunto com TMZ em células U87MG e T98G de glioblastoma resultaram no aumento da atividade da Caspase 3 em ambas as linhagens, induzindo apoptose e demonstrando que há relação direta entre o aumento da expressão da proteína e a resistência tumoral à TMZ.

Estudos na literatura têm demonstrado que nutrientes como ácidos graxos e compostos bioativos de alimentos como a curcumina podem ter uma função importante de modulação da expressão de transportadores ABC, resultando em um novo alvo em potencial para investigação dentro do contexto de terapias adjuvantes (Cort e Ozben, 2015).

Sreenivasan et al. (2013) observaram que a curcumina aumentou o acúmulo de Rodamina 123 durante o Ensaio de Atividade de MRPs e diminuiu seu efluxo em células de retinoblastoma Y79 que expressavam o gene *ABCB1*.

Das e Madhavi (2011) analisaram a ação de ácidos graxos poli-insaturados em células de câncer cervical sensíveis e resistentes à VCR. Notou-se que ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 administrados isoladamente aprimoraram a captação de VCR e a diminuição da atividade de MRPs em células sensíveis e resistentes ao quimioterápico, além de aumentarem a suscetibilidade de células tumorais, especialmente células resistentes a drogas, à ação citotóxica da VCR.

1.10. ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são moléculas que possuem vários átomos de carbono ligados entre si por ligações simples ou duplas e tem um grupo carboxila em uma das extremidades e um grupo metila na outra extremidade (Figura 9) (Andrade et al., 2006). Apresentam-se na forma saturada (carbonos em ligações simples) ou insaturada (carbonos com uma ou mais duplas ligações). No caso de apenas uma dupla ligação na cadeia, o ácido graxo é denominado monoinsaturado e no caso de duas ou mais ligações é chamado de poli-insaturado (PUFA – do inglês *PolyUnsaturated Fatty Acid*) (Tvrzicka et al., 2011).

Os PUFAs são classificados de acordo com o número de carbonos presentes em sua estrutura, bem como o número de ligações duplas na cadeia e a posição dessas ligações a partir do grupo metil terminal (Das, 2006).



Figura 9. Estrutura química de um ácido graxo, com um grupo metil terminal e um grupo carboxila.

Os grupos mais conhecidos são o ômega 3 (ω -3 ou n-3), composto principalmente pelo ácido α -linolênico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA); e o ômega 6 (ω -6 ou n-6), como o ácido linoleico (LA), ácido araquidônico (AA) e ácido gama-linolênico (GLA) (Calder, 2015). Dentre os PUFAs, o ácido linoleico (LA) e ácido α -linolênico (ALA) são classificados ainda como ácidos graxos essenciais (AGEs) por serem adquiridos apenas através da

dieta, não sendo sintetizados pelo organismo humano (Vartak et al., 1998; Klack et al., 2012; Bello et al., 2013).

LA e ALA são encontrados principalmente em óleos vegetais de sementes como girassol, linhaça, canola e, embora o ser humano sintetize PUFAs de cadeia longa (LC-PUFAs) a partir desses AGEs, a eficiência de conversão é baixa, não chegando à 5%, mesmo em adultos saudáveis, fazendo com que a maior parte dos ácidos graxos não essenciais, por sua vez, seja obtida também através da alimentação (Joffre et al., 2019).

O ácido graxo ômega 6 AA é encontrado principalmente em alimentos de origem animal, como carnes e ovos. Já os ácidos graxos omega 3 EPA e DHA são obtidos através do consumo de peixes como salmão e atum (Strobel et al., 2012). Em indivíduos vegetarianos e veganos, observa-se que a alta ingestão de ALA proveniente dos óleos vegetais e sementes pode otimizar a síntese de EPA e DHA tanto em homens quanto em mulheres (Burdge e Henry, 2018), não havendo portanto deficiência desses nutrientes em uma dieta equilibrada e adequada. Segundo a OMS, a relação n-6/n-3 ideal de ingestão é de 5:1, mas as dietas ocidentais estão próximas de 20:1 (Simopoulos, 2002).

Além da ingestão, os níveis de ômega 3 também são influenciados pela presença de ômega 6; isso porque há uma competição pelas enzimas de alongação para a produção dos respectivos derivados de cadeia longa através dos precursores LA e ALA e também para incorporação em membranas celulares (Sprecher et al., 1995).

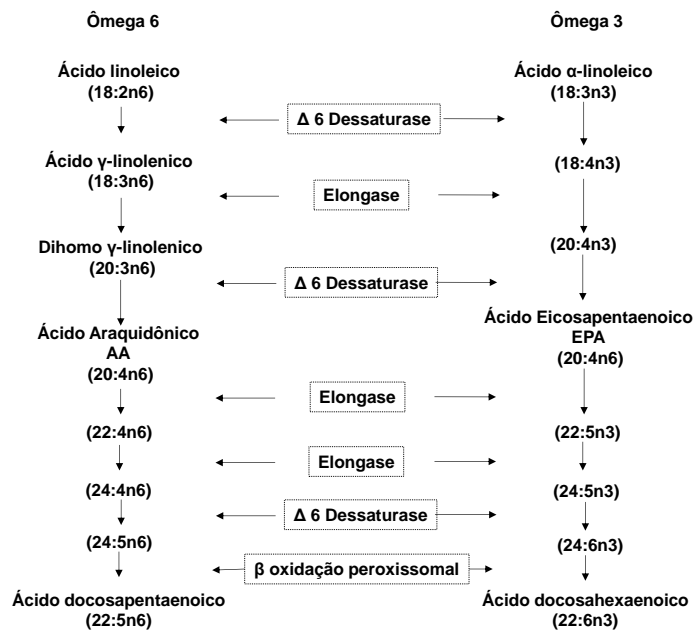


Figura 10. Elongação dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 3.

Os ácidos graxos estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções estruturais e nos processos metabólicos (Martin et al., 2006). Em humanos, são necessários para manter em condições adequadas as membranas celulares, as funções cerebrais, como o desenvolvimento cognitivo, transmissão de impulsos nervosos e funcionamento e diferenciação das membranas da retina (Waitzberg, 2006).

Quando incorporados à membrana fosfolipídica, podem ser metabolizados e transformados em mediadores inflamatórios ativos, os eicosanoides, formando prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) e tromboxanos (TB) que agirão no organismo em caráter pró-inflamatório ou anti-inflamatório. (Perini et al., 2010; Colquhoun et al, 2009).

Em condições patológicas como o câncer, esses ácidos graxos são capazes de alterar a expressão gênica de algumas proteínas, podendo levar a diminuição da capacidade migratória e invasiva de células tumorais, induzindo até mesmo a apoptose (Colquhoun et al., 2009).

EPA e DHA têm sido descritos na literatura para prevenir a expansão de células de câncer colorretal e para indução de morte celular e aumento da sensibilidade aos quimioterápicos em células-B em leucemia linfocítica crônica já que as características funcionais desses PUFAs se tornam potencialmente benéficas em combinação com fármacos, além do efeito anti-inflamatório devido à diminuição na produção de citocinas inflamatórias (Abdi et al., 2014).

Além disso estimularam também a formação de peróxidos lipídicos, interação com segundos mensageiros e vias de sinalização das células tumorais e modulação da estrutura e/ou função de receptores celulares sugerindo um aumento seletivo na apoptose de tecidos tumorais comparado ao tecido neural sadio (Jing et al., 2013).

Em células resistentes à múltiplas drogas a ação desses ácidos graxos foi além da produção de peróxidos lipídicos e interação com diferentes vias de sinalização. Segundo Gelsomino et al. (2013) observou-se que em células de câncer colorretal, PUFAs foram incorporados à membrana, alterando a composição lipídica e permitindo a ação das drogas no meio intracelular.

Em Kuan et al. (2011) observou-se que em células Caco-2 de câncer colorretal tanto os ácidos graxos ômega 3 quanto ômega 6 reduziram a expressão gênica de *ABCB1* e a atividade de MDR1.

Plumb et al. (1993) observou diferença na composição lipídica da membrana celular de linhagens de câncer de ovário humano que antes eram resistentes à doxorubicina e foram submetidas ao tratamento com ácidos graxos poli-insaturados. Essa premissa justificou o fato de o acúmulo extracelular do fármaco ter diminuído em comparação ao meio não tratado.

Em Davies et al. (1999) células de câncer de mama (MCF-7) resistentes a drogas foram submetidas ao tratamento adjuvante com GLA ocasionando um aumento global na captação do quimioterápico, sugerindo que a incorporação de ácidos graxos nas membranas celulares das células resistentes podem causar uma mudança na distribuição intracelular do fármaco.

No estudo de Xue e Schlozer (2016) os ácidos graxos ômega 3 tiveram um papel importante quanto agentes antitumorais em tumores mamários tratados com doxorubicina. Os PUFAs elevaram o estresse oxidativo nas células cancerosas tornando-as suscetíveis a ação do quimioterápico.

Em gliomas, um estudo do nosso grupo de pesquisa (Miyake et al., 2020), demonstrou mudanças no comportamento de células C6 de glioma de rato após o tratamento com GLA relacionadas a migração e invasão diminuídas e aumento do número de células apoptóticas. Em um outro estudo, Colquhoun (2001) demonstrou que EPA é uma potente agente citotóxico nas células cancerosas de bexiga, além de contribuir com o aumento da citotoxicidade de quimioterápicos.

Esses estudos indicam que além da atividade isolada demonstrada através da diminuição da proliferação celular, os ácidos graxos podem auxiliar a ação da

quimioterapia em células resistentes atenuando o crescimento tumoral e tornando-se uma possibilidade de terapia adjuvante junto aos tratamentos já existentes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos experimentos realizados e apresentados, notamos que células resistentes à TMZ e à VCR nas concentrações de 25 μ M e 0.4nM tratadas com ácidos graxos EPA, DHA e GLA apresentam diferentes perfis para o aumento ou diminuição da atividade de proteínas de resistência, bem como a expressão gênica dos diferentes transportadores ABC e a incorporação dos ácidos graxos, dependendo não somente do PUFA utilizado, mas também da droga utilizada em conjunto.

Os principais resultados encontrados são:

- Células U87MG expostas aos quimioterápicos Vincristina e Temozolomida adquiriram resistência considerando a expressão de genes específicos para moldar esse perfil, como o *MGMT*;
- A expressão de *ABCB1* em células U87MG é reduzida em tratamentos combinados entre VCR e GLA;
- VCR + EPA reduzem o número de células ao final de 72h, diminuem a expressão de *ABCB1*, *ABCC3* e *ABCC4* e diminui a atividade de proteínas de resistência no geral;
- VCR em combinação com PUFAs é capaz de modificar a expressão gênica de *ABCC4*;
- DHA modifica a expressão de *ABCB1* em células resistentes a TMZ e VCR em tratamentos concomitantes;

- A incorporação de ácidos graxos bem como o metabolismo dos lipídeos pode ser modificada diante da presença de diferentes quimioterápicos;
- A atividade das proteínas foi significativa apenas em tempos específicos, mas a área sob a curva não demonstrou variação importante diante dos tratamentos apresentados, porém em intervalos mais curtos os resultados talvez se apresentariam mais expressivos, visto que um efeito platô é observado nas curvas, sugerindo diminuição da atividade das proteínas de resistência.

Cada combinação teve uma característica bastante específica, o que corrobora com questões encontradas na literatura, mas os estudos sobre a influência de ácidos graxos poli-insaturados em glioblastoma são escassos e a partir da relevância dos dados encontrados, é importante frisar o quanto novos estudos podem demonstrar algumas questões importantes sobre o tratamento de um dos cânceres mais agressivos em humanos de acordo com a OMS.

Ter a possibilidade de fornecer às pessoas maior qualidade de vida, bem como trazer conforto diante dos tratamentos a que são acometidas é um dos grandes objetivos da ciência para com a população, que é sem dúvida alguma, a parte principal que mantém os cientistas ativos, mesmo que indiretamente.

Fazer ciência e pesquisa básica é o estopim para que algo inovador seja disponibilizado à toda a população, por isso, esse trabalho mostra o quanto é

importante apoiar a pesquisa em nosso país. É para o bem comum. É para o bem de todos.

7. REFERÊNCIAS

1. Abdi J, Garssen J, Faber J, Redegeld FA. Omega-3 fatty acids, EPA and DHA induce apoptosis and enhance drug sensitivity in multiple myeloma cells but not in normal peripheral mononuclear cells, 2014. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol 25, p1254-1262. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.013>.
2. Abe T, Koike K. Chemosensitisation of spontaneous multidrug resistance by a 1,4-dihydropyridine analogue and verapamil in human glioma cell lines overexpressing MRP or MDR1, 1995. *Br J Cancer*. 72, 2, 418–423. doi: 10.1038/bjc.1995.348
3. Agnihotri S, Burrell, KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G. Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies, 2012. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* DOI 10.1007/s00005-012-0203-0
4. Alpsy, A. Yasa, S. Gündüz, U. Etoposide resistance in MCF-7 breast cancer cell line is marked by multiple mechanisms, 2013. *Biomedicine & Pharmacotherapy* Vol 68, p351-355. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.09.007>
5. Andrade PMM, Carmo MGT. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. *Rev mn metabólica* 2006; p135-147.
6. Atkins RJ, Ng W, Stylli SS, Hovens CM, Kaye AH: Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment, 2015. *J Clin Neurosci* 22: 14–20, 2015 doi: 10.1016/j.jocn.2014.09.003.

7. Avramis IA, Kwock R, Avramis VI. Taxotere and vincristine inhibit the secretion of the angiogenesis inducing vascular endothelial growth factor (VEGF) by wild-type and drug-resistant human leukemia T-cell lines. *Anticancer Res.* 2001;21:2281–6
8. Azaj M, Jefferies S, Brazil L, Watts C, Chalmers A. Current and Investigational Drug Strategies for Glioblastoma, 2014. *Clinical Oncology* 26, 419-430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clon.2014.03.012>
9. Bell HS, Wharton SB, Leaver HA, Whittle IR: Effects of N-6 essential fatty acids on glioma invasion and growth: experimental studies with glioma spheroids in collagen gels. *J Neurosurg*, 1999; 91: 989–96
10. Bello KJ, Fang H, Fazeli P, Bolad W, Corretti M, Magder LS, Petri M. Omega-3 in SLE: a double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of endothelial dysfunction and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2013; 33(11):2789-96. doi: 10.1007/s00296-013-2811-3.
11. Bouzinab K, Summers H, Zhang J, Stevens MFG, Moody CJ, Turyanska L, Thomas NR, Gershkovich P, Ashford MB, Vitterso E, Storer LCD, Grundy R, Bradshaw TD. In search of effective therapies to overcome resistance to Temozolomide in brain tumours, 2019. *Cancer Drug Resist*; 2:1018-31. <http://dx.doi.org/10.20517/cdr.2019.64>
12. Burdge GC, Henry CJ. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in Vegetarians, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811230-4.00011-9>

13. Butowski NA. Epidemiology and Diagnosis of Brain Tumors, 2015. CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology, 21, 301–313. doi: 10.1212/01.CON.0000464171.50638.fa.
14. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health, 2015. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition Volume XX Number X Month 201X 1–15. American Society for Parenteral and Enteral Nutrition DOI: 10.1177/0148607115595980
15. Cambruzzi E. The role of IDH1/2 mutations in the pathogenesis of secondary glioblastomas, 2017. J Bras Patol Med Lab, v. 53, n. 5, p. 338-344. doi: 10.5935/1676-2444.20170055
16. Cavalcanti Júnior GB, Klumb CE, Maia RC. p53 and hematological malignancies, 2002. Revista Brasileira de Cancerologia, 48(3): 419-427.
17. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance Neurotherapeutics (2017) 14:284–297 DOI 10.1007/s13311-017-0519-x
18. Cieślak A, Trottier J, Verreault M, Milkiewicz P, Vohl MC, Barbier O. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Stimulate Bile Acid Detoxification in Human Cell Models, 2018. Canadian J Gastro and Hepatology. <https://doi.org/10.1155/2018/6031074>
19. Colquhoun A and Schumacher RI: Gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. Biochim Biophys Acta 2001; 1533: 207

20. Colquhoun A. Mechanisms of action of eicosapentaenoic acid in bladder cancer cells in vitro: alterations in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation and apoptosis induction, 2009. p1885-1893
21. Corsetto, P.A., Colombo, I., Kopecka, J., Rizzo, A.M., Riganti, C. ω -3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids as Sensitizing Agents and Multidrug Resistance Revertants in Cancer Therapy, 2017. International Journal of Molecular Sciences. <https://doi.org/10.3390/ijms18122770>
22. Cort A, Ozben T. Natural Product Modulators to Overcome Multidrug Resistance In Cancer. Nutrition and Cancer. 2015. Journal Nutrition and Cancer, Vol 67, p411-423. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1002624>
23. D'Eliseo D, Velotti F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. J Clin Med. 2016 Jan 26;5(2):15. doi: 10.3390/jcm5020015.
24. Das UN, Madhavi N, Kumar GS, Padma M, Sangeetha P. Can tumour cell drug resistance be reversed by essential fatty acids and their metabolites?: 1998. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, Vol 58, p39-54. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(98\)90128-4](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(98)90128-4)
25. Das UN. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology, 2006. Biotechnol. J. 1, 420–439. DOI 10.1002/biot.200600012
26. Das UN, Madhavi N. Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells in vitro. 2011. Lipid in Health and Disease. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-159>

27. Davies CL, Loizidou M, Cooper AJ, Taylor I. Effect of gamma-linolenic acid on cellular uptake of structurally related anthracyclines in human drug sensitive and multidrug resistant bladder and breast cancer cell lines, 1999. *European Journal of Cancer*, p1534-1540, doi: 10.1016/s0959-8049(99)00181-1
28. de Gooijer MC, de Vries NA, Buckle T, Buil LCM, Beijnen JH, Boogerd W, van Tellingen O. Improved Brain Penetration and Antitumor Efficacy of Temozolomide by Inhibition of ABCB1 and ABCG21, 2018. *Neoplasia*, 20, 7, 710-720. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.05.001>
29. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, 2001. *J Lipid Res*; 42, 1007-17.
30. DeWitt JC, Mock A, Louis DN. The 2016 WHO classification of central nervous system tumors: what neurologists need to know, 2017. *Curr Opin Neurol*, 30:643–649 DOI:10.1097/WCO.0000000000000490
31. Diamandis P, Aldape K. World Health Organization 2016 Classification of Central Nervous System Tumors. 2018
32. Domenichini A, Adamska A, Falasca M. ABC transporters as cancer drivers: Potential functions in cancer development, 2019. *BBA - General Subjects* 1863, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.019>
33. Eskilsson E, Gro G, Solecki V, Gergely. EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro-Oncology* 20(6), 743–752, 2018 | doi:10.1093/neuonc/nox191

34. Ewaschuk JB, Newell M, Field CJ. Docosahexanoic acid improves chemotherapy efficacy by inducing CD95 translocation to lipid rafts in ER(-) breast cancer cells. *Lipids* 2012;47:1019–30.
35. Fahrmann JF, Hardman WE. Omega 3 fatty acids increase the chemosensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine. *Lipids Health Dis.* 2013 Mar 16;12:36. doi: 10.1186/1476-511X-12-36
36. Fantappiè O, Masini, E., Sardi, I., Raimondi, L., Bani, D., Solazzo, M., Vannacci, A., Mazzanti, R. The MDR Phenotype Is Associated With the Expression of COX-2 and iNOS in a Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line. 2002. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.32469>
37. Ferlay J. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer*: 144, 1941–1953 (2019) © 2018 UICC
38. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 2010. 18:553–67. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.015
39. Gelsomino G et al. Omega 3 fatty acids chemosensitize multidrug resistant colon cancer cells by down-regulating cholesterol synthesis and altering detergent resistant membranes composition. *Molecular Cancer*. 2013
40. Goellner EM, Grimme B, Brown AR, Lin YC, Wang XH , Sugrue KF, Mitchell L, Trivedi RN, Tang J, Sobol RW. Overcoming Temozolomide Resistance in

Glioblastoma via Dual Inhibition of NADp Biosynthesis and Base Excision Repair, 2011. *Cancer Res*, 71, 6, 2308-2317. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3213

41. Guérard M, Johnson G, Dertinger S, Duran-Pacheco G, Funk J, Zeller A. Dose–response relationship of temozolomide, determined by the *Pig-a*, comet, and micronucleus assay, 2017. doi:10.1007/s00204-016-1923-4
42. Guo Z, Zhu J, Zhao L, Luo Q, Jin X. Expression and clinical significance of multidrug resistance proteins in brain tumors, 2010. *J Exp Clin Cancer Res*. 29(1): 122. doi: 10.1186/1756-9966-29-122
43. Haber M, Smith J, Bordow SB, *et al.* Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma, 2006. *J Clin Oncol*.
44. Hanahan D.; Weiberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, p646-674
45. Hawkins C, Walker E, Mohamed N, *et al.* BRAF-KIAA1549 Fusion Predicts Better Clinical Outcome in Pediatric Low-Grade Astrocytoma. *Clin Cancer Res Cancer Res* 2011; 17: 4790–98.
46. Herrlinger U, Tzaridis T, Mack F, Steinbach JP, Schlegel U, Sabel M, Hau P, Kortmann RD *et al.* Group of the German Cancer Society. Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated *MGMT* promoter (CeTeG/NOA–09): a randomised, open-label, phase 3 trial, 2019. *Lancet*; 393: 678–88. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31791-4

47. Hombach-Klonisch S, Mehrpourb M, Shojaeia S, Harlose C, Pitze M, Hamaib A, Siemianowiczg K, Likush W, Wiecheci E, Toyota B D, Hoshyark R, Seyfoorim A, Sepehria Z, Andeo SR, Khademp F, Akbarim M, Gorman AM, Samaliq A, Klonischa T, Ghavamia S. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response, 2018. *Pharmacology and Therapeutics*, 184, 13-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.017>
48. Horbach L, Sinigaglia M, Da Silva CA, Olguins DB, Gregianin LJ, Brunetto AL, Brunetto AT, Roesler R, De Farias CB. Gene expression changes associated with chemotherapy resistance in Ewing sarcoma cells. *Mol Clin Oncol*. 2018 Jun;8(6):719-724. doi: 10.3892/mco.2018.1608.
49. Huang J, Yu J, Tu L, Huang N, Li H and Luo Y. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: From Basic Discovery to Therapeutics Development *Front.*, 2019. *Oncol*. 9:506. doi: 10.3389/fonc.2019.0050
50. Huff LM, Sackett DL, Poruchynsky MS, Fojo T. Microtubule-disrupting chemotherapeutics result in enhanced proteasome-mediated degradation and disappearance of tubulin in neural cells. *Cancer Res*. 2010 Jul 15;70(14):5870-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4281.
51. INCA – Instituto Nacional de Câncer. O que é o câncer. Ministério da Saúde, Brasília –DF, 2009
52. Jakel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation, 2017. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Vol 11. doi:10.3389/fncel.2017.00024

53. Jiang P, Mukthavaram R, Chao Y, Bharati IS, Fogal V, Pastorino S, Cong X, Nomura N, Gallagher M, Abbasi T, Vali S, Pingle SC, Makale M, Kesari S. Novel anti-glioblastoma agents and therapeutic combinations identified from a collection of FDA approved drugs. *J Transl Med.* 2014 Jan 17;12:13. doi: 10.1186/1479-5876-12-13.
54. Jiapaer S, Furuta T, Tanaka S, Kitabayashi T, Nakada M. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma, 2018. *Neurol Med Chir*, 58, 405-421. doi: 10.2176/nmc.ra.2018-0141
55. Jing K, Wu T, Lim K. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013 Oct;13(8):1162-77. doi: 10.2174/18715206113139990319
56. Joffre C. Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in the Brain and Brain Cells, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.88232>
57. Kartal-Yandim M, Adan-Gokbulut A, Baran Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer, 2015. *Critical Reviews in Biotechnology.* Vol 36, p716-726 <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1015957>
58. Klack K, Bonfa E, Neto EFB. Dieta e aspectos nutricionais no lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2012; p384-408
59. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:215–25 [discussion 226–219].
60. Kloosterhof NK, Bralten LB, Dubbink HJ, French PJ, van den Bent MJ. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of

diffuse glioma? *Lancet Oncol.* (2011) 12:83–91. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70053-X

61. Kohsaka S, Wang L, Yachi K, Mahabir R, Narita T, Itoh T, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Tanaka S. STAT3 Inhibition Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma by Downregulating MGMT Expression, 2012. *Mol Cancer Ther*; 11(6); 1289–99. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0801
62. Kuan CY, Walker TH, Luo PG, Chen CF. Long-chain polyunsaturated fatty acids promote paclitaxel cytotoxicity via inhibition of the MDR1 gene in the human colon cancer Caco-2 cell line. *J Am Coll Nutr.* 2011 Aug;30(4):265-73. doi: 10.1080/07315724.2011.10719969.
63. Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumors in adults, 2018. *Lancet*, 436-446. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30990-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30990-5)
64. Lassman LP, Pearce GW, Gang J. Sensitivity of intracranial gliomas to vincristine sulphate. *Lancet*, 1965, 1:296-297.
65. Leclercq S, Skrzypski J, Courvoisier A, Gondcaille C, Bonnetain F, André A, Chardigny JM, Bellenger S, Bellenger J, Narce M, Savary S. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on the expression of peroxisomal ABC transporters. *Biochimie.* 2008 Oct;90(10):1602-7. doi: 10.1016/j.biochi.2008.05.022
66. Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme, 2016. *Genes and Disease*, 3, 198-210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>
67. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler DO, Cavenee KW, Burger CP, Jouvet A, Scheitauer WB, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumors of the

- Central Nervous System, 2007. *Acta Neuropathol.*, p97-109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
68. 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, 2016. *Acta Neuropathol.* 131, 803–820. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
69. Maher EA, McKee AC. Neoplasms of the central nervous system. In: Skarin, AT.; Canellos, GP., editors. *Atlas of Diagnostic Oncology*. 3. London, United Kingdom: Elsevier Science Ltd; 2003
70. Maor Y, Benadiba M, Almogi- Hazan O, Serruya R, Or R. *In vitro* Influence of Different Fatty Acids on the Pharmacological Effect of Temozolomide. *J Transl Neurosci*, 2018
71. Martin CA. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr.* vol.19 no.6 Campinas Nov./Dec. 2006
72. Matsumoto, Y. Tamiya, T., Nagao, S. Resistance to topoisomerase II inhibitors in human glioma cell lines overexpressing multidrug resistant associated protein (MRP) 2, 2005. *The Journal of Medical Investigation*, Vol. 52, p41-48. <https://doi.org/10.2152/jmi.52.41>
73. McNeill K. Epidemiology of Brain Tumors, 2016. *Neurol Clin* 34. p 981–998 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.014>

74. Mirchia K, Richardson TE. Beyond IDH-Mutation: Emerging Molecular Diagnostic and Prognostic Features in Adult Diffuse Gliomas, 2020. *Cancers*, 12, 1817; doi:10.3390/cancers12071817
75. Miyake JA, Gomes RN, Colquhoun A. Gamma-linolenic acid alters migration, proliferation and apoptosis in human and rat glioblastoma cells, 2020. *Prostaglandins and Other Lipid Mediator*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2020.106452>
76. Mohammadgholi A, Rabbani-Chadegani A, Fallah S. Mechanism of the interaction of plant alkaloid vincristine with DNA and chromatin: spectroscopic study. *DNA Cell Biol*. 2013 May;32(5):228-35. doi: 10.1089/dna.2012.1886.
77. Mohammed, I.S., He, W., Yin, L. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR, 2018. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Vol 100, p335-348. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.038>
78. Moradi Sarabi M, Doosti M, Einollahi N, Hesami SS, Dashti N. Effect of eicosapentaenoic acid on the expression of ABCG1 gene in the human monocyte THP-1 cells. *Acta Med Iran*. 2014;52(3):176-81.
79. Munoz JL, Walker ND, Scotto KW, Rameshwar P. Temozolomide competes for P-glycoprotein and contributes to chemoresistance in glioblastoma cells, 2015. *Cancer Letters* 367, 69–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.013>
80. Newell M, Mackey JR, Bigras G, Alvarez-Camacho M, Goruk S, Ghosh S, Schmidt A, Miede D, Chisotti A, Postovit L, Baker K, Mazurak V, Courneya K,

Berendt R, Dong WF, Wood G, Basi SK, Joy AA, King K, Meza-Junco J, Zhu X, Field C. Comparing docosahexaenoic acid (DHA) concomitant with neoadjuvant chemotherapy versus neoadjuvant chemotherapy alone in the treatment of breast cancer (DHA WIN): protocol of a double-blind, phase II, randomised controlled trial. *BMJ Open*. 2019 Sep 17;9(9):e030502. doi: 10.1136/bmjopen-2019-030502.

81. Newell M, Baker K, Postovit LM, Field CJ. A Critical Review on the Effect of Docosahexaenoic Acid (DHA) on Cancer Cell Cycle Progression. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 17;18(8):1784. doi: 10.3390/ijms18081784.
82. Niero EL, Rocha-Sales B, Lauand C, Cortez BA, Souza MM, Rezende-Teixeira P, Urabayashi MS, Martens AA, Neves JH, Machado-Santelli GM. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches, 2014. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. p33-37. doi: 10.1186/1756-9966-33-37
83. Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Xu, J., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz- Sloan, J. S. (2016). CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro-Oncology*,18, v1–v75.
84. Panagopoulos AT, Gomes RN, Almeida FG, da Costa Souza F, Veiga JCE, Nicolaou A, Colquhoun. A. The prostanoid pathway contains potential prognostic markers for glioblastoma. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2018 Jul;137:52-62.

85. Park KJ, Yu MO, Park DH, Park JY, Chung YG, Kang SH. Role of vincristine in the inhibition of angiogenesis in glioblastoma, 2016. *Neurological Research*, 38:10, 871-879, DOI: 10.1080/01616412.2016.1211231
86. GBD 2016 Brain and Other CNS Cancer Collaborators. Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019 Apr;18(4):376-393. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30468-X.
87. Perazzoli, G., Prados, J., Ortiz, R., Caba, O., Cabeza, L., Berdasco, M., Melguizo, C. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression, 2015. *Plos One*, Vol 10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140131>
88. Perini JAL, Stevanato FB, et al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: metabolism in mammals and immune response, 2010. *Rev. Nutr., Campinas*, 23(6):1075-1086
89. Plumb JA, Luo W, Kerr DJ. Effect of polyunsaturated fatty acids on the drug sensitivity of human tumour cell lines resistant to either cisplatin or doxorubicin. *Br J Cancer*. 1993;67(4):728-733. doi:10.1038/bjc.1993.133
90. Raabe EH, Lim KS, Kim JM, Meeker A, Mao XG, Nikkhah G, Maciaczyk J, Kahlert U, Jain D, Bar E, Cohen KJ, Eberhar CG. BRAF Activation Induces Transformation and Then Senescence in Human Neural Stem Cells: A Pilocytic Astrocytoma Model, 2011. *Clin Cancer Res*; 17(11). doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3349

91. Ramachandran C, Nair SM, Escalon E, Melnick SJ. Potentiation of etoposide and temozolomide cytotoxicity by curcumin and turmeric force™ in brain tumor cell lines. *J Complement Integr Med.* 2012 Aug 10;9:Article 20. doi: 10.1515/1553-3840.1614
92. Rasmussen R. Rapid Cycle Real-time PCR. *Methods and Applications*, 2001. Springer Press, p21-34. DOI: 10.1007/978-3-642-59524-0
93. Rehulka et al. Cellular effects of the microtubule-targeting agent peloruside A in hypoxia-conditioned colorectal carcinoma cells, *BBA - General Subjects*, 2017
94. Řehulka, J., Annadurai, N., Frydrych, I., Znojek, P., Džubák, P., Northcote, P., Miller, J.H., Hajdúch, M., Das, V. Cellular effects of the microtubule-targeting agent peloruside A in hypoxia-conditioned colorectal carcinoma cells, 2017. *Biochim Biophys Acta.* p1833-1843. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.03.023.
95. Rogers KR, Kikawa KD, Mouradian M, et al. Docosahexaenoic acid alters epidermal growth factor receptor-related signaling by disrupting its lipid raft association. *Carcinogenesis* 2010;31:1523–30.
96. Roth W, Fontana A, Trepel M, Reed JC, Dichgans J, Weller M. Immunochemotherapy of malignant glioma: synergistic activity of CD95 ligand and chemotherapeutics. *Cancer Immunol Immunother.* 1997 Mar;44(1):55-63. doi: 10.1007/s002620050355.
97. Schuartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Prat Neurol* 2006, 2, 9 494-503.

98. Selawry OS, Hananian J. Vincristine treatment of cancer in children. *JAMA*. 1963 Mar 2;183:741-6. doi: 10.1001/jama.1963.03700090061010.
99. Shukla S, Ohnuma S, Ambudkar SV. Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters, 2011. *Curr Drug Targets*; 12(5): 621–630
100. Simopoulos, AP. Omega 3 Fatty Acids in inflammation and autoimmune diseases, 2002. *Journal of American College of Nutrition*. Vol 21, n°6, 495-505
101. Skinner M, Ward SM, Nilsson CL, Emrick T. Augmenting Glioblastoma Chemotherapy with Polymers, 2018. *ACS Chem, Neurosci*,9,8-10. DOI: 10.1021/acchemneuro.7b00168
102. Smit J.J.M., Schinkel A.H., Oude Elferink R.P.J., Groen A.K., Wagenaar E., Van Deemter L., Mol C.A.A.M, Ottenhof R., Van der Lugt N.M.T, Van Roon M., Van der Valk M.A., Ojerhaus G.J.A, Berns A.J.M., Borst P.. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease, 1993. *Cell*, 75 451-462.
103. Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen ZS. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance, 2012. *Chin J Cancer*. 2012, 31, 2, 58–72. doi: 10.5732/cjc.011.10329
104. Sprecher, H., Luthria, D., Mohammed, B., Baykousheva, S., 1995. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res*. 36, 2471–2477.
105. Sreenivasan S, Ravichandran S, Vetrivel U, Krishnakumar S. Modulation of multidrug resistance 1 expression and function in retinoblastoma cells by

- curcumin, 2013. *J Pharmacol Pharmacother*, 4, 103-109. DOI: 10.4103/0976-500X.110882
106. Stavrovskaya AA, Shushanov SS, Rybalkina EY. Problems of Glioblastoma Multiforme Drug Resistance, 2016. *Biokhimiya (Biochemistry - Moscow)*, 81, 2, 179-190. DOI: 10.1134/S0006297916020036
107. Stritzelberger J, Distel L, Buslei R, Fietkau R, Putz F. Acquired temozolomide resistance in human glioblastoma cell line U251 is caused by mismatch repair deficiency and can be overcome by lomustine, 2018. *Clin Transl Oncol*, 20, 508–516. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1743-x>
108. Strobel C, Jahreis G, Kuhnt K. Survey of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in fish and fish products, 2012. *Lipid in health and disease*. 11:144
109. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, 2005. *N Engl J Med* 2005; 352:987-996 DOI: 10.1056/NEJMoa043330
110. Tanaka N, Yamaguchi H, Mano N. Transport of Eicosapentaenoic Acid-Derived PGE3, PGF3a, and TXB3 by ABCC4, *PLoS ONE* 2014, 9(10): e109270
111. Teixeira LA. De uma doença desconhecida a um problema de saúde pública: INCA e o controle de câncer no país. 172 p. Rio de Janeiro. 2007. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_desconhecida_saude_publica.pdf
112. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – A Review. Part 1: Classification, dietary sources and biological functions, 2011. *Biomed Pap Med*

Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub; 155(2):117–130. DOI
10.5507/bp.2011.038

113. VanderSluis L, Mazurak VC, Damaraju S, Field CJ. Determination of the Relative Efficacy of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid for Anti-Cancer Effects in Human Breast Cancer Models. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2607. Published 2017 Dec 4. doi:10.3390/ijms18122607
114. Vartak S, McCaw R, Davis CS, Robbins ME, Spector AA. Gamma-linolenic acid (GLA) is cytotoxic to 36B10 malignant rat astrocytoma cells but not to 'normal' rat astrocytes. *Br J Cancer*. 1998;77(10):1612-1620. doi:10.1038/bjc.1998.264
115. Vlachostergios, P.J.; Hatzidaki, E.; Stathakis, N.E.; Koukoulis, G.K.; Papandreou, C.N. Bortezomib downregulates MGMT expression in T98G glioblastoma cells, 2013. *Cell Mol. Neurobiol.*, 33, 313–318.
116. Waitzberg, D.L. *Dieta, Nutrição e Câncer*. Editora Atheneu. 2006; p79.
117. Wang F, Bhat K, Doucette M, Zhou S, Gu Y, Law B, Liu X, Wong ET, Kang JX, Hsieh TC, Qian SY, Wu E. Docosahexaenoic acid (DHA) sensitizes brain tumor cells to etoposide-induced apoptosis. *Curr Mol Med*. 2011 Aug;11(6):503-11. doi: 10.2174/156652411796268740.
118. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008 Jul 31;359(5):492-507. doi: 10.1056/NEJMra0708126. Erratum in: *N Engl J Med*. 2008 Aug 21;359(8):877.

119. Wesseling, P; Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas, 2018. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 44, 139–150 doi: 10.1111/nan.12432
120. Wijaya J, Fukuda Y, Schuetz JD. Obstacles to Brain Tumor Therapy: Key ABC Transporters. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2544. doi:10.3390/ijms18122544
121. Wilkens, S. Structure and mechanism of ABC transporters, 2015. *F1000Prime Reports*, Vol 7, <http://doi.org/10.12703/P7-14>
122. Wilson CB, Hoshino T. Current Trends in the Chemotherapy of Brain Tumors with Special Reference to Glioblastomas, 1969. *J. Neurosurgery*. Vol 31.
123. Wu CP, Calcagno AM and Ambudkar SV. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: Evaluation of current strategies, 2008. *Curr Mol Pharmacol*. 2008, 1,2, 93–105. DOI: 10.2174/1874467210801020093
124. Xu H, Zong H, Chong M, Xing M, Ming S, Kai L, Xiaoguang H, Hai D, Lei C. Epidermal growth factor receptor in glioblastoma (Review). *ONCOLOGY LETTERS* 14: 512-516, 2017. DOI: 10.3892/ol.2017.6221
125. Xue H; Schlotzer E. Nutrition Modulation of Cardiotoxicity and Anticancer Efficacy Related to Doxorubicin Chemotherapy by Glutamine and ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2016,p52-66
126. Yoon BH, Park JS, Kang S, Kwon NJ, Lee KS, Kim CY, Choe G. IDH-wildtype secondary glioblastoma arising in IDH-mutant diffuse astrocytoma: a case report, 2020. *British Journal of Neurosurgery*, DOI: 10.1080/02688697.2020.1837733

127. Yoshino A. et al. Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas, 2010
128. Zanders ED, Svensson F, Bailey DS. Therapy for glioblastoma: is it working?, 2019. Drug Discovery Today, 24, 1193-1201. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.008>
129. Zhang M, Yang D, Gold B. Origin of mutations in genes associated with human glioblastoma multiform cancer: random polymerase errors versus deamination, 2019. Heliyon 5 e01265. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01265
130. Zhang Y, Dube C, Gibert Jr M., Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, Yang Y, Setiady I, Deveau C, Saoud K, Grello C, Oxford M, Yuan F, Abounader R. The p53 Pathway in Glioblastoma, 2018. Cancers, 10, 297; doi:10.3390/cancers10090297
131. Zheng HC. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. Oncotarget. 2017 Jul 6;8(35):59950-59964. doi: 10.18632/oncotarget.19048
132. Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, Li Y. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development, 2008. Curr Med Chem. Vol 15, p1981-2039. doi: 10.2174/092986708785132870