

# *Glutamato induz radioresistência em glioblastomas humanos*

THAIS JACOVAS<sup>1</sup>  
DAIANE DOS SANTOS<sup>2</sup>  
PATRYCK STANGL BOSCHETTI<sup>2</sup>  
CLENARA DOCENA<sup>3</sup>  
AROLDO BRAGA FILHO<sup>4</sup>  
IVAN CHEMALE<sup>5</sup>  
IVANA GRIVICICH<sup>6</sup>  
ADRIANA BRONDANI DA ROCHA<sup>7</sup>

## RESUMO

*Os glioblastomas (GBMs) são os tumores cerebrais mais agressivos. Além disso, apresentam resistência intrínseca à radioterapia. Considerando que a maior liberação de glutamato tem relação com a agressividade dos GBMs, investigamos a participação do glutamato na resposta à radioterapia em GBMs cultivados a partir de amostras obtidas por ressecção cirúrgica. Para tal, culturas de UGBM1 e UGBM2 foram tratados com 2, 5 e 10 Gy de radiação ionizante na presença ou não de glutamato (5 mM), DNQX (500 µM) ou BSO (25 µM). Nossos resultados mostraram que o glutamato diminuiu a sensibilidade dos dois cultivos à radioterapia,*

<sup>1</sup> Acadêmico do curso de Medicina /ULBRA- Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>2</sup> Acadêmico do curso de Medicina/ULBRA

<sup>3</sup> Acadêmico do Programa de Pós Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA

<sup>4</sup> Médico do Serviço de Radioterapia do Hospital São Lucas/PUCRS

<sup>5</sup> Médico do Serviço de Neurocirurgia do Hospital Beneficência de Porto Alegre

<sup>6</sup> Professor do Curso de Biomedicina/ULBRA e do PPG Genética e Toxicologia Aplicada e Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA

<sup>7</sup> Professor Orientador – Curso de Medicina/ULBRA (brondani@terra.com.br)

cujo efeito foi inibido pelo DNQX e BSO. Estes achados sugerem que a ação protetora induzida pelo glutamato à radioterapia em GBMs ocorre via receptores de AMPA e GSH.

**Palavras-chave:** gliomas, glioblastoma, radioresistência, glutamato, glutathione.

## ABSTRACT

*Glioblastomas (GBMs) are the most aggressive brain tumors. These tumors also display an intrinsic resistance to radiotherapy. Since the higher glutamate release is associated to a more GBM aggressive behavior, we investigated the glutamate involvement on the response of GBM cultures obtained from samples of surgical resection. Thus, UGBM1 and UGBM2 cultures were treated with 2, 5 and 10 Gy of ionizing radiation in the presence or absence of glutamate (5 mM), DNQX (500  $\mu$ M) or BSO (25  $\mu$ M). Our results showed that glutamate had decrease radiotherapy sensitivity in both GBM cultures, which is diminished after DNQX or BSO treatments. These data suggest that the protective effect of glutamate in response to radiotherapy in GBMs are mediated by AMPA receptors and GSH.*

**Key words:** gliomas, glioblastomas, radioresistance, glutamate, glutathione.

## INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM) representa 25% dos tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) nos adultos e está associado com prognóstico ruim. A ressecção cirúrgica é a terapia de escolha e deve ser seguida pela radioterapia, associada ou não à quimioterapia (BRANDES et al., 2008). No entanto, tumores, como o GBM, respondem com limitada eficácia à radioterapia em função da radioresistência intrínseca desses tumores (HUSSAINI et al., 2002; ROCHA et al., 2004; CHANG et al., 2007; NODA et al., 2009).

Vários estudos sugerem que o glutamato desempenhe um papel central na proliferação, na manutenção celular de GBMs e na invasão dos tecidos adjacentes às células tumorais (ISHIUCHI et al., 2007; LYONS et al., 2007; SCHUNEMANN et al., 2010). O glutamato é o principal neurotransmissor

excitatório de mamíferos (FONNUM, 1984). Em situações onde o glutamato permanece por tempo prolongado, ou em concentrações elevadas na fenda sináptica, se observa produção de danos celulares provocados pelo excesso da estimulação dos receptores glutamatérgicos, fenômeno conhecido como excitotoxicidade (LIPTON, 1999; MELDRUM, 2000). A excitotoxicidade leva à necrose de neurônios vizinhos, permitindo, dessa forma, mais espaço para o crescimento tumoral (NOCH; KHALILI, 2009). De um modo geral, os gliomas são capazes de liberar grande quantidade de glutamato para o meio extracelular e a liberação ativa desse aminoácido ocorre via carreador cistina: glutamato (YE; ROTHSTEIN; SONTHEIMER, 1999; YE; SONTHEIMER, 1999; IWAMOTO et al., 2010). Neste sentido, a liberação de glutamato pelo glioma pode facilitar tanto a progressão quanto a invasão desses tumores (IWAMOTO et al., 2010). O uso de antagonistas dos receptores NMDA e dos receptores

AMPA reforça esta idéia ao demonstrar que sua utilização diminui o crescimento tumoral de gliomas (RZESKI; TURSKI; IKONOMIDOU, 2001).

A glutathiona (GSH) e seus complexos enzimáticos funcionam como um sistema de detoxificação que desempenha importante papel na proteção das células contra danos induzidos pelos radicais livres e desta forma, podem proteger contra os efeitos da radiação ionizante (O'BRIEN; TEW, 1996; ZHONG et al., 1999; YANG; CHAN; YU, 2006; ZENGIN et al., 2009). O conteúdo de GSH e seus sistemas, tem sido relacionado ao padrão de comportamento dos gliomas em resposta aos tratamentos que induzem estresse oxidativo (YANG; CHAN; YU, 2006; ZENGIN et al., 2009). A maior entrada de cistina na célula pode resultar em maior síntese de GSH, representando um possível mecanismo associado à radioresistência e progressão dos GBMs promovidos pelo glutamato. Portanto, no presente estudo, avaliamos o efeito do glutamato sobre a resposta celular dos GBMs em cultivo após radiação ionizante.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das Amostras Tumorais

Os cultivos primários derivados de GBMs e denominados UGBM1 e UGBM2 foram produzidos a partir de amostras coletadas de dois pacientes sem tratamento prévio e submetidos a ressecção cirúrgica no Hospital Beneficência Portuguesa em Porto Alegre – RS. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ULBRA e os pacientes

assinaram o termo de consentimento autorizando o uso das amostras (CEP 2003-098).

### Preparo e Manutenção dos Cultivos

O cultivo celular primário foi estabelecido de acordo com Farr-Jones (1999). Fragmentos de aproximadamente 3 mm foram processados, onde as amostras foram dissociadas mecanicamente excluindo-se os vasos e o estroma. As células foram incubadas, centrifugadas e o *pellet* celular foi semeado em frascos de cultivo com meio DMEN/F12 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) contendo 20% de soro fetal bovino (FCS) (Cultilab Campinas, SP, Brasil). Os cultivos celulares foram mantidos a uma temperatura de 37°C, a umidade relativa mínima de 95%, e a atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após estabilização desses cultivos em meio 5% de FCS foram realizados os experimentos (após 50 passagens) com restrição da concentração de soro durante 7 dias.

### Tratamentos dos Cultivos Celulares com Radiação Ionizante

Os tratamentos com radiação ionizante foram realizados através da exposição dos cultivos em semi-confluência de UGBM1 e UGBM2 mantidos em frascos de 25 cm<sup>2</sup>. As células foram tratadas com doses de 2, 5 e 10 Gy de radiação ionizante, com tempos de exposição de 1'76'', 4'39'' e 8'79'', respectivamente, utilizando-se um acelerador linear Telecobalto Theratron Phoenix Philips SR 7510 (Eindhoven, Holanda), com uma distância fonte-campo de 70 cm.

## Tratamentos dos Cultivos Celulares com Glutamato, DNQX ou BSO

Os cultivos foram tratados com glutamato, 6,7-Dinitroquinoxalina-2,3-dione (DNQX) ou L-buthionina-SR-sulfoximina (BSO) (Sigma - St. Louis, NY, EUA) por 48 horas com concentrações estabelecidas em estudos prévios. O BSO foi utilizado como pré-tratamento de 24 horas em relação ao glutamato. Para tal, o glutamato (5 mM), DNQX (500  $\mu$ M) ou BSO (25  $\mu$ M) foram diluídos em meio de cultura contendo 0,5% de FCS.

## Determinação do Efeito da Radiação ou Glutamato na Viabilidade Celular

Para analisar o efeito imediato da radiação ou glutamato, foi avaliado o número de células viáveis a cada 24 horas durante 6 dias, utilizando-se o método de exclusão por *trypan blue*. Assim, as células tratadas e não tratadas foram inoculadas na densidade de 1500 células/*well* em placas de 24 *wells*. As células coradas e não coradas foram quantificadas em hemocitômetro em microscópio invertido. A viabilidade celular foi expressa a partir da razão entre as células coradas e não coradas.

## Determinação do efeito do Glutamato, DNQX ou BSO na formação de colônias

Os cultivos de UGBM1 e UGBM2 tratados ou não foram inoculados em placas de cultivo de 6 *wells*, na densidade de 400 células/*well* e mantidas em cultivo por 14 dias. Após, as células foram fixadas com etanol 70% a 4°C e coradas com cristal violeta 0,1% para a contagem das colônias forma-

das. Foram consideradas as colônias com mais de 50 células e a fração de sobrevivência (SF) foi calculada de acordo com a fórmula (PETERSEN,2000):

$$SF = \frac{\text{Número de colônias nas células tratadas} \times 100}{\text{Número de colônias nas células controle}}$$

## Análise estatística

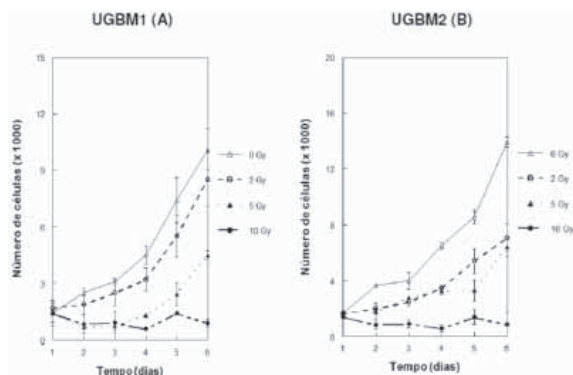
A análise estatística foi realizada através do teste *t de Student* com  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas através de programa estatístico *Instat* versão 3.01 (Graphpad,USA).

# RESULTADOS

## Efeito da Radiação Ionizante sobre a Proliferação Celular

Os cultivos celulares de UGBM1 e UGBM2 foram submetidos a doses de radioterapia de 2, 5 ou 10 Gy de radiação ionizante. Logo após o tratamento, as células viáveis foram quantificadas a cada 24 h durante 6 dias de cultivo. As células irradiadas sofreram diminuição no seu crescimento e na sua proliferação enquanto os controles (não irradiados) mantiveram o seu crescimento exponencial (Figura 1). Na dose de 2 Gy, o cultivo de UGBM1 não apresentou queda significativa na proliferação celular (Figura 1A). Enquanto a UGBM2 demonstrou queda significativa da proliferação a partir do segundo dia posterior ao tratamento com esta dose ( $p < 0,05$ ) (Figura 1B). Com o tratamento de 5 Gy, ambos os cultivos apresentaram queda significativa na proliferação celular a partir do segundo dia ( $p < 0,05$ ). O efeito mais pronunciado sobre a proliferação celular foi observado na dose de 10 Gy, onde em ambos os

cultivos se verifica diminuição significativa no crescimento celular após as primeiras 24 h ( $p < 0,05$ ). Em ambos os cultivos as diferenças se mantêm até o dia 6 de cultivo ( $p < 0,05$ ).

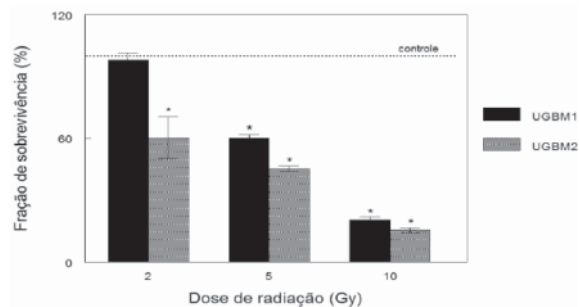


**Figura 1.** Número de células viáveis após irradiação dos cultivos de UGBM1 (A) e UGBM2 (B). Após a irradiação com 2, 5 ou 10 Gy as células viáveis foram quantificadas a cada 24 h. Os resultados representam valores de média ( $n=6$ ) e desvio padrão de 3 experimentos independentes.

## Efeito da Radiação Ionizante sobre a Formação de Colônias Celulares

O efeito tardio da radiação foi investigado por ensaio clonogênico. As células foram submetidas às doses de radiação e foram inoculadas em placas de cultivo para a avaliação do efeito da radiação sobre o número de colônias 14 dias após o tratamento. Com 2 Gy de irradiação, a UGBM2 apresentou queda de 40% na fração de sobrevivência ( $p < 0,05$ ). Nesta mesma dose, não se observa diminuição significativa na fração de sobrevivência do cultivo de UGBM1. Com o tratamento de 5 Gy, ambos os cultivos tiveram redução na fração de sobrevivência. O cultivo de UGBM1 apresentou uma diminuição de 40%

na fração de sobrevivência, quando comparado ao controle, enquanto na UGBM2 se observa diminuição de 55% ( $p < 0,05$ ). Na dose de 10 Gy a fração de sobrevivência dos cultivos de UGBM1 foi de apenas 20% e, 15% para UGBM2 (Figura 2).



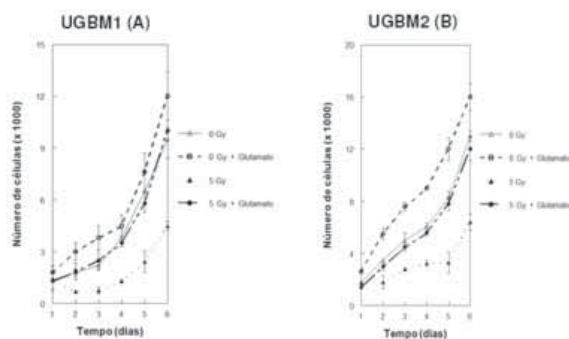
**Figura 2.** Fração de sobrevivência dos cultivos de UGBM1 e UGBM2 irradiados com 2, 5 ou 10 Gy. Os valores representam valores de média ( $n=6$ ) e desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes. Os dados são apresentados como fração de sobrevivência e os controles são representados como 100% de fração de sobrevivência. \* Valor considerado significativamente diferente do controle  $p < 0,05$ .

O padrão de sensibilidade tardio à radiação ionizante mostrou-se semelhante tanto no efeito agudo quanto no tardio. A dose de 5 Gy foi selecionada para os experimentos subsequentes, considerando que seu efeito de inibição de crescimento agudo (a cada 24 h) e tardio (14 dias) foi intermediário para os cultivos estudados.

## Efeito do Tratamento com Glutamato na Proliferação Celular após Radiação Ionizante

O aminoácido glutamato tem sido associado a mecanismos de invasão e proliferação dos gliomas.

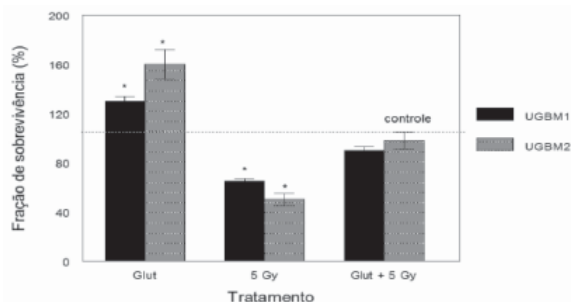
Como a progressão dos gliomas malignos resulta em maior resistência dos GBMs à radioterapia, avaliamos o efeito do glutamato na resposta celular à radiação ionizante. O tratamento com 5 mM de glutamato promoveu aumento na proliferação das células não irradiadas quando comparadas aos controles. No cultivo de UGBM1 este aumento não é significativo, enquanto na UGBM2 se observa aumento significativo a partir do segundo dia ( $p < 0,05$ ). Na dose de 5 Gy de radiação se observa diminuição significativa na proliferação celular em UGBM1 e UGBM2 ( $p < 0,05$ ). No entanto, em ambos os cultivos, o pré-tratamento com glutamato (5 mM) restabeleceu o comportamento da proliferação celular ao nível dos controles, ainda que submetidas a 5 Gy de irradiação ionizante (Figura 3). Estes resultados sugerem que o glutamato esteja envolvido em mecanismos associados a maior tolerância do GBM aos efeitos da radiação ionizante.



**Figura 3.** Número de células viáveis após irradiação dos cultivos de UGBM1 (A) e UGBM2 (B) pré tratados ou não com glutamato. Os cultivos pré-tratados ou não com glutamato (5 mM) foram submetidos ou não a irradiação ionizante (5 Gy). Após, as células viáveis foram contadas a cada 24 h. Os resultados representam valores de média ( $n=6$ ) e desvio padrão de 3 experimentos independentes.

## Efeito do Tratamento com Glutamato na Fração de Sobrevivência após Radiação Ionizante

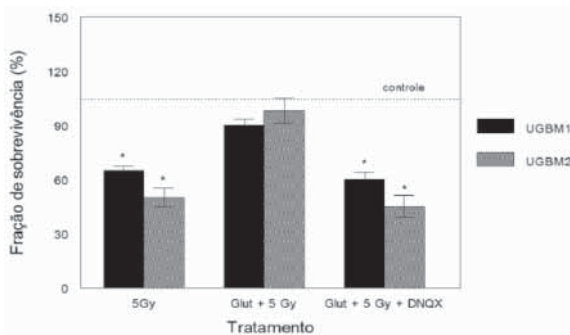
Quando foi avaliado o efeito do glutamato sobre a fração de sobrevivência celular, o comportamento celular foi bastante semelhante ao que se observa no efeito agudo do tratamento com glutamato e irradiação (Figura 4).



**Figura 4.** Fração de sobrevivência dos cultivos UGBM1 e UGBM2 após tratamento com glutamato (5 mM) ou irradiação (5 Gy). Os valores representam valores de média ( $n=6$ ) e desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes. Os dados são apresentados como percentuais de fração de sobrevivência e os controles são representados como 100% de fração de sobrevivência e os controles são representados como 100% de fração de sobrevivência. \* Valor considerado significativamente diferente do controle  $p < 0,05$ .

A adição do antagonista de receptor AMPA – DNQX, restabelece os efeitos da radiação induzidos pela dose de 5 Gy (Figura 5). Estes resultados indicam que o glutamato promove proteção contra a radiação nos cultivos de UGBM1 e UGBM2 através de mecanismos envolvendo ativação dos receptores AMPA.

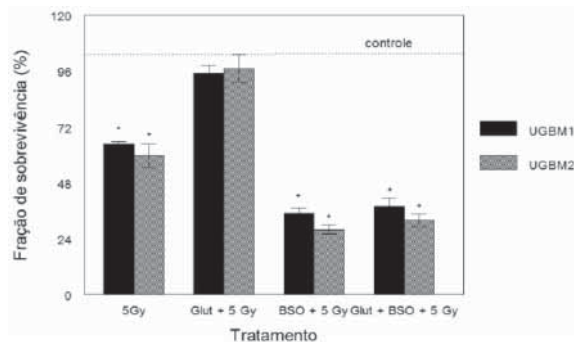




**Figura 5.** Fração de sobrevivência dos cultivos UGBM1 e UGBM2 após tratamento com glutamato (5 mM), irradiação (5 Gy) ou DNQX (500 mM). Os valores representam valores de média (n=6) e desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes. Os dados são apresentados como percentuais de fração de sobrevivência e os controles são representados como 100% de fração de sobrevivência. \*Valor considerado significativamente diferente do controle  $p < 0,05$ .

Para avaliar se a resposta celular induzida após tratamento com glutamato e radiação ionizante tem a participação da GSH as células foram pré tratadas com o inibidor de GSH – BSO. O pré tratamento com o inibidor de GSH promove diminuição significativa na fração de sobrevivência em ambos os cultivos celulares ( $p < 0,05$ ), demonstrando seu efeito radiosensibilizante.

Quando o pré-tratamento com BSO foi combinado ao tratamento com glutamato, verificamos que o efeito de proteção do glutamato sobre o crescimento celular desapareceu nos cultivos de UGBM1 e UGBM2 ( $p < 0,05$ ) (Figura 6). Assim, os resultados sugerem que a ação protetora sobre ambos os cultivos promovida pelo glutamato envolva o sistema de captação da cistina, culminando na produção de GSH.



**Figura 6.** Fração de sobrevivência dos cultivos UGBM1 e UGBM2 após tratamento com glutamato (5 mM), irradiação (5 Gy) ou DNQX (500 mM). Os valores representam valores de média (n=6) e desvio padrão obtidos de 3 experimentos independentes. Os dados são apresentados como percentuais de fração de sobrevivência e os controles são representados como 100% de fração de sobrevivência. \*Valor considerado significativamente diferente do controle  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

A radioterapia pós cirurgia é a principal estratégia de tratamento dos GBMs, porém sua eficácia é comumente limitada pela radioresistência dos GBMs (VAN DEN BENT; AFRA; DE WHITE, 2005; BRANDES, 2008). Por isso, a sobrevida média dos pacientes com GBM fica em torno de 12 meses e apenas 3% sobrevivem mais de 5 anos após ressecção cirúrgica e tratamento com radiação ionizante (BRANDES, 2008). Em nosso estudo utilizamos cultivos celulares derivados de fragmentos teciduais de pacientes portadores de GBMs sem história prévia de outras neoplasias cerebrais. Os cultivos primários são considerados um modelo experimental com maior proximidade do tecido original quando comparados ao modelo de linhagens (SHARMA et al., 2003; KUNZ-SCHUGHART et al., 2004; KNIGHT et al., 2005).

A radioresistência dos GBMs já foi demonstrada pela recorrência local do volume irradiado (SNEED et al.,1994). No presente estudo, avaliamos a participação do glutamato na radiosensibilidade de dois cultivos primários de GBM (UGBM1 e UGBM2). Verificamos que, em resposta ao tratamento radioterápico ambos os cultivos - UGBM1 e UGBM2 - apresentaram inibição dose-dependente na proliferação celular tanto no período imediato (proliferação celular) quanto no tardio (formação de colônias) após irradiação ionizante. Entretanto, observamos uma nítida diferença na sua radiosensibilidade, o que se mostrou de acordo com a heterogeneidade clínica tipicamente observada nos GBMs (HOMMA et al.,2006).

Os tumores do SNC tem uma característica exclusiva que é a restrição ao seu crescimento pelo arcabouço ósseo. Tem sido sugerido que os gliomas de alto grau crescem na margem externa do tumor, liberando o neurotransmissor glutamato diretamente no tecido cerebral em concentrações que são suficientes para causar a morte de neurônios e de algumas células da glia, propiciando mais espaço para o crescimento dos gliomas (CHUNG et al, 2005; LYONS et al., 2007; SONTHEIMER, 2008). Sabe-se que a capacidade de liberação de glutamato é diretamente proporcional ao crescimento tumoral *in vivo*, independente da taxa de proliferação e da atividade mitótica das células investigadas (LYONS et al., 2007; SONTHEIMER, 2008). Há duas possíveis hipóteses para estes achados: (1) o glutamato liberado pela célula tumoral facilita a expansão do tumor ao provocar a degeneração do tecido neural adjacente e a liberação de substâncias pró inflamatórias que podem favorecer o crescimento tumoral; (2) o glutamato pode estar

agindo diretamente sobre as células tumorais como um fator trófico.

Quando avaliamos a citotoxicidade do glutamato nos cultivos de UGBM1 e UGBM2 (dados não mostrados neste trabalho), verificamos que ambos os cultivos celulares demonstraram resistência relativa aos efeitos do glutamato. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios conduzidos por nosso grupo e também com investigações de outros grupos de pesquisa (CAMPBELL et al., 1985; YE; ROTHSTEIN; SONTHEIMER, 1999; TAKANO et al., 2001; REGNER et al., 2005, SCHUNEMANN et al., 2010). Comparativamente, a resistência aos efeitos citotóxicos do glutamato em GBMs foi pelo menos 45 vezes maiores que as concentrações tóxicas nos tecidos gliais normais (CHEN; LIAO; KUO, 2000; MATUTE et al., 2002).

O tratamento com 5 mM de glutamato promoveu aumento na proliferação das células. No cultivo de UGBM1 este aumento não é significativo, enquanto na UGBM2 se observa aumento significativo, indicando mais uma vez, a heterogeneidade típica dos GBMs (HOMMA et al., 2006). Em ambos os cultivos, o tratamento com 5 mM de glutamato tornou as células mais tolerantes aos efeitos da radiação ionizante e o crescimento se manteve nos níveis do controle. A adição do DNQX, antagonista dos receptores AMPA nos cultivos de UGBM1 e UGBM2 desfaz o efeito potencializador sobre o crescimento verificado por aumento na fração de sobrevivência com o tratamento com 5 mM de glutamato, indicando o envolvimento dos receptores AMPA nas respostas mediadas pelo glutamato após a radiação ionizante. Neste sentido, diferentes estudos identificaram papel relevante dos re-



ceptores AMPA na progressão, crescimento e invasão dos gliomas malignos (VANHOUTTE; HERMANS, 2008; VAN VUURDEN et al., 2009). Estes achados terminaram encorajando e justificando a condução de estudos clínicos em gliomas malignos com o inibidor de receptor AMPA – talampanel. Os resultados do protocolo de fase II encorajam a continuidade das investigações, tendo em vista que o agente tem excelente penetrância no SNC e boa tolerabilidade (IWAMOTO et al., 2010).

A habilidade da radioterapia de induzir dano ao DNA e apoptose está bem documentada em vários tipos de células (LOWE; LIN, 2000). Nos experimentos deste trabalho não avaliamos a apoptose e seus marcadores, no entanto, observamos que a adição de glutamato tornou os cultivos mais tolerantes à radiação ionizante garantindo a continuidade da proliferação celular imediatamente após a radioterapia. Neste caso, é possível sugerir que estão sendo desencadeadas vias antiapoptose nas células tratadas com glutamato. Os mecanismos envolvidos nesta resposta não foram investigados neste estudo.

A liberação de glutamato pelos gliomas ocorre como uma consequência da captação do aminoácido cistina via sistema Xc expresso na membrana plasmática. Através deste sistema a célula importa cistina na troca por glutamato (SATO et al., 1999; YE; SONTHEIMER, 1999). No interior da célula, a cistina é utilizada como precursor na síntese do agente redutor GSH. A inibição farmacológica do sistema Xc inibe a produção de GSH e diminui expressivamente o crescimento dos tumores cerebrais *in vivo* (CHUNG et al., 2005). Além disso, o conteúdo de GSH e seus sistemas, tem sido relacionado ao padrão de comportamento dos gliomas em

resposta a tratamentos que induzem estresse oxidativo (YANG ; CHANG; YU.,2006; ZENGIN et al.,2009). A radiação ionizante promove danos celulares através da geração de espécies reativas de oxigênio, utilizando-se de sistemas antioxidantes, os gliomas se protegem dos potenciais danos (ZHONG et al., 1999; MARTÍN et al.,2007). Desta forma, o aumento no conteúdo de GSH pode representar um mecanismo pelo qual o glutamato esteja protegendo as células de GBM contra os efeitos da radiação ionizante.

Ao analisarmos o efeito do BSO na fração de sobrevivência de UGBM1 e UGBM2 após irradiação, observamos que o pré-tratamento com o inibidor de GSH promove diminuição significativa na fração de sobrevivência em ambos os cultivos celulares, demonstrando efeito radiosensibilizante. Quando o pré- tratamento com BSO foi combinado ao tratamento com glutamato, verificamos maior efeito da radiação ionizante na inibição de crescimento em UGBM1 e UGBM2. Assim, os resultados sugerem que a ação protetora sobre as respostas de UGBM1 e UGBM2 promovidas pelo glutamato envolvam o sistema de captação da cistina, culminando na produção de GSH.

Ainda que os cultivos celulares proporcionem um bom modelo do comportamento e da biologia dos tumores, não refletem a realidade *in vivo*. Afinal, não podem ser desconsideradas as diferenças no que diz respeito a: disponibilidade de nutrientes, importância do espaço extracelular e presença de células neurais viáveis. Em situações *in vivo*, os GBMs possuem uma maior disponibilidade de precursores para a síntese de glutamato, o que associado a morte citotóxica das células neuronais adjacentes a massa tumoral pode elevar constantemente as

concentrações de glutamato (ROSLIN et al., 2003). Ainda, o espaço extracelular *in vivo* é aproximadamente dez mil vezes menor que o espaço extracelular do cultivo em monocamada. No entanto, as informações sobre mecanismos e comportamento celular identificados nos cultivos celulares são etapas necessárias e fundamentais para se avaliar a possibilidade de estabelecer protocolos *in vivo* ou até mesmo clínicos para a investigação terapêutica (DJEDID et al., 2009; KANU et.al.,2009).

## CONCLUSÃO

Em suma, os resultados do presente estudo demonstram que o glutamato, além de promover crescimento dos GBMs deve estar envolvido em mecanismos de resistência à radioterapia via receptores AMPA e utilizando-se do sistema GSH. Ainda que os achados deste estudo não possam nos levar a uma explicação relativa ao mecanismo que correlaciona estes fenômenos, é possível sugerir que o papel protetor do glutamato na resposta celular ao estresse oxidativo, induzido pela radiação ionizante, seja mais amplamente investigado para que se possam avaliar estratégias de radiosensibilização dos GBMs.

## REFERÊNCIAS

BRANDES, A. A. et al. Glioblastoma in adults. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 67, p. 139-152, 2008.

CAMPBELL, G. L. et al. Effect of glutamate analogues on brain tumor cell lines. **Journal of Neurochemistry**, v. 45, p. 1186–1192, 1985.

CHANG, J. E. et al. Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. **Clinical Advances in Hematology & Oncology**. v. 5, p. 894-902, 2007.

CHEN, C. J.; LIAO, S. L.; KUO, J. S. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 1557-1565, 2000.

CHUNG, W.J. et al. Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 7101-7110, 2005.

DJEDID, R. et al. Glioblastoma treatment in 2010. **Revue Médicale de Bruxelles**, v. 30, p. 496-505, 2009.

FARR-JONES, M. A.; PARNEY, I. F.; PETRUK, K. C. Improved technique for establishing short term human brain tumor cultures. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 43, p. 1-10, 1999.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 42, p. 1-11, 1984.

HOMMA, T. et al. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 65, p. 846 854, 2006.

HUSSAINI, I. M. et al. Protein kinase C- $\eta$  regulates resistance to UV- and gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma cells by preventing caspase-9 activation. **Neuro-Oncology**, v. 4, p. 9-21, 2002.

ISHIUCHI, S. et al. Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblas-

- toma via Akt activation. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 7987-8001, 2007.
- IWAMOTO, F. M. et al. Phase 2 trial of talampanel, a glutamate receptor inhibitor, for adults with recurrent malignant gliomas. **Cancer**, 2010.
- KANU, O. O. et al. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clinical Medicine*. **Oncology**, v. 3, p. 39-52, 2009.
- KNIGHT, L. A. et al. Pilot studies of the effect of zoledronic acid (Zometa) on tumor-derived cells ex vivo in the ATP- based tumor chemosensitivity assay. **Anticancer Drugs**, v. 16, p. 969-976, 2005.
- KUNZ-SCHUGHART, L. A. et al. The use of 3- D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 9, p. 273-285, 2004.
- LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, v. 79, p.1431-1568, 1999.
- LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 485-495, 2000.
- LYONS, S. A. et al. Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion. **Cancer Research**, v. 67, p. 9463-9471, 2007.
- MARTÍN, V. et al. Signaling pathways involved in antioxidant control of glioma cell proliferation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 1715-1722, 2007.
- MATUTE, C. et al. Excitotoxicity in glial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 447, p. 239-246, 2002.
- MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1007S-1015S, 2000.
- NODA, S. E. et al. Molecular advances of brain tumors in radiation oncology. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 19, p. 171-178, 2009.
- NOCH, E.; KHALILI, K. Molecular mechanisms of necrosis in glioblastoma: the role of glutamate excitotoxicity. **Cancer Biol Ther.**, v. 8, n. 19, p. 1791-1797, out. 2009.
- O'BRIEN, M. L.; TEW, K. D. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. **European Journal of Cancer**, v. 32, p. 967-978, 1996.
- PETERSEN, C. et al. Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 2513-2520, 2000.
- REGNER, A. et al. Effects of toxic doses of glutamate on Cu-Zn and Mn/superoxide dismutases activities in human glioma cell lines. **Journal of Neuro-oncology**, v. 71, p. 9-17, 2005.
- ROCHA, A. B. et al. Radioresistance is associated to increased Hsp70 content in human glioblastoma cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 25, p. 777-785, 2004.
- ROSLIN, M. et al. Baseline levels of glucose metabolites, glutamate and glycerol in malignant glioma assessed by stereotactic microdialysis. **Journal of Neuro- Oncology**, v. 61, p. 151-160, 2003.

RZESKI, W.; TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C. Glutamate antagonists limit tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 6372-6377, 2001.

SATO, H. et al. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 11455-11458, 1999.

SCHUNEMANN, D. P. et al. Glutamate Promotes Cell growth by EGFR signaling on U-87 Human Glioblastoma Cell Line. **Pathology and Oncology Research**, v. 16, p. 285-293, 2010.

SHARMA, S. et al. Outcome of ATP-based tumor chemosensitivity assay directed chemotherapy in heavily pre-treated recurrent ovarian carcinoma. **BMC Cancer**, v. 3, p. 19, 2003.

SNEED, P. K. et al. Patterns of recurrence of glioblastoma multiforme after external irradiation followed by implant boost. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 29, p. 719-727, 1994.

SONTHEIMER. A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, p. 287-295, 2008.

TAKANO, T. et al. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. **Nature Medicine**, v. 7, p. 1010-1015, 2001.

VAN DEN BENT, M. J.; AFRA, D.; DE WHITE, O. EORTC Radiotherapy and Brain Tumor Groups and the UK Medical Research Council: Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma

and oligodendroglioma in adults: The EORTC 22845 randomised trial. **Lancet.**, v. 366, p. 985-990, 2005.

VANHOUTTE, N.; HERMANS, E. Glutamate-induced glioma cell proliferation is prevented by functional expression of the glutamate transporter GLT-1. **FEBS Letters**, v. 582, p. 1847-1852, 2008.

VAN VUURDEN, D. G. et al. Attenuated AMPA receptor expression allows glioblastoma cell survival in glutamate-rich environment. **PLoS One**, v. 4, p. 5953, 2009.

YANG, M. S.; CHAN, H. W.; YU, L. C. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. **Toxicology**, v. 226, p. 126-130, 2006.

YE, Z. C.; ROTHSTEIN, J. D.; SONTHEIMER, H. Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 10767-10777, 1999.

YE, Z. C.; SONTHEIMER, H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. **Cancer Research**, v. 59, p. 4383-4391, 1999.

ZENGİN, E. et al. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in different types of intracranial tumors within their relative peritumoral tissues. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 111, p. 345-351, 2009.

ZHONG, W. et al. Expression of Superoxide Dismutases, catalase, and glutathione peroxi-

dase in glioma cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 1334-1345, 1999.