

POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE MONOFOSFOESTERES LIPÍDICO EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Data de aceite: 12/12/2019

Data de submissão: (14/11/2019)

Laerty Garcia de Sousa Cabral

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP
Instituto Butantan, São Paulo-SP

Manuela Garcia Laveli da Silva

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP
Instituto Butantan, São Paulo-SP

Monique Gonçalves Alves

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP
Instituto Butantan, São Paulo-SP

Henrique Hayes Hesse

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP
Instituto Butantan, São Paulo-SP

Sergio Mestieri Chammas

Instituto Butantan, São Paulo-SP
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade

Maria Carla Petrellis

Instituto Butantan, São Paulo-SP

Rosa Andrea Nogueira Laiso

Instituto Butantan, São Paulo-SP

Rosely Cab Durvanei Augusto Maria

Instituto Butantan, São Paulo-SP

RESUMO: O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo de astrocitoma primário maligno e de maior ocorrência. É responsável por mais de 60% de todos os tumores cerebrais em adultos. Apesar da variedade de terapias modernas contra o GBM, ainda é uma doença mortal com prognóstico extremamente ruim. Os pacientes geralmente têm uma sobrevida média de aproximadamente 14 a 15 meses a partir do diagnóstico. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos e antiproliferativos de três monofosfoesteres (MFE) em células de glioblastoma multiforme humano U-138. A determinação da atividade citotóxica dos compostos foi avaliada pelo método colorimétrico MTT. O tratamento com o MFE-1 apresentou citotoxicidade para a célula tumoral U-138, com valores de $IC_{50\%}$ 18,16 e 11,6 mM no período de 24 e 48h, gerando alterações morfológicas de toxicidade. Para o tratamento com MFE-2 o valor de $IC_{50\%}$ foi de 30,22 e 25mM nos períodos de 24 e 48h, com alterações significativas na morfologia e redução da confluência. O composto MFE-3 não foi efetivo para o tratamento *in vitro* das células tumorais U-138, com valores de $IC_{50\%}$ 76,74 e 67,8 mM. Quando comparando os compostos em relação à efetividade *in vitro*, sua capacidade antiproliferativa e citotóxica para a célula de glioblastoma multiforme U-138,

o monofosfoester 1 apresentou menor $IC_{50\%}$ em ambos os períodos de tratamento, 24 e 48h, em comparação com os demais compostos testados. O MFE-3 não apresentou um resultado significativo, obtendo um $IC_{50\%}$ 4 vezes maior que o monofosfoester 1 no período de 24h e aproximadamente 6 vezes maior quando comparando o valor obtido para o período de 48h.

PALAVRAS-CHAVE: Glioblastoma, monofosfoester, câncer, citotoxicidade

ANTIPROLIFERATIVE POTENTIAL OF LIPIDIC MONOPHOPHOSTERES IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS

ABSTRACT: Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common type of malignant primary astrocytoma. It accounts for over 60% of all brain tumors in adults. Despite the variety of modern therapies against GBM, it is still a deadly disease with extremely poor prognosis. Patients usually have an average survival of approximately 14 to 15 months from diagnosis. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic and antiproliferative effects of three monophosphoesters (MFE) on U-138 human glioblastoma multiforme cells. The determination of cytotoxic activity of the compounds was evaluated by the MTT colorimetric method. Treatment with MFE-1 presented cytotoxicity to tumor cell U-138, with IC_{50} values 18.16 and 11.6 mM in the 24 and 48h period, generating morphological changes of toxicity. For the treatment with MFE-2 the $IC_{50\%}$ value was 30.22 and 25mM in the 24 and 48h periods, with significant changes in morphology and reduction of confluence. Compound MFE-3 was not effective for in vitro treatment of U-138 tumor cells, with $IC_{50\%}$ values 76.74 and 67.8 mM. When comparing the compounds with respect to their in vitro effectiveness, their antiproliferative and cytotoxic capacity for the U-138 glioblastoma multiforme cell, monophosphoester 1 had a lower $IC_{50\%}$ in both treatment periods, 24 and 48h, compared to the other compounds. Monophosphoester 3 did not present a significant result, obtaining an $IC_{50\%}$ 4 times higher than monophosphoester 1 in the 24h and approximately 6 times higher when comparing the value obtained for the 48h treatment.

KEYWORDS: Glioblastoma, monophosphoester, cancer, cytotoxicity

1 | INTRODUÇÃO

Ao sistema nervoso central (SNC) pertencem um grupo heterogêneo de cânceres gliais e não gliais raros, sendo os gliomas responsáveis pela maioria de todos os tumores malignos do sistema nervoso central em adultos, representando 81% dos tumores malignos do cérebro, são altamente vascularizados e resistentes à apoptose (CROCETTI et. al, 2012). O glioblastoma multiforme (GBM), um glioma de grau IV, é o tumor cerebral maligno primário mais comum em adultos.

Embora o GBM seja um tumor raro com incidência global inferior a 10 por 100.000 pessoas, seu mau prognóstico com taxa de sobrevivência de 14 a 15 meses, após o diagnóstico o torna um problema crucial de saúde pública (CROCETTI et. al, 2012; OSTROM et. al, 2014; OSTROM E GITTLEMAN, 2014). Não há terapias eficazes atuais para a doença, o prognóstico para pacientes com GBM é ruim, com uma sobrevida mediana de no máximo 14 a 16 meses, a taxa de sobrevida para 5 anos é de ~5,5% (CROCETTI et. al, 2012; GILBERT et. al, 2014; CHINOT et. al, 2014; TAAL et. al, 2014).

O padrão de cuidados atual para GBM envolve ressecção cirúrgica e tratamentos de acompanhamento com radioterapia e quimioterápicos, como temozolomida (TMZ), bem como bevacizumab, um anticorpo monoclonal direcionado ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Embora a TMZ seja considerada um dos agentes quimioterapêuticos mais eficazes para prolongar a sobrevida dos pacientes com GBM (LAI et, al, 2018), esses tratamentos, incluindo a TMZ, não proporcionaram nenhuma sobrevida a longo prazo, e a recorrência é muito comum. A recorrência de gliomas de grau IV é devida à dificuldade de se obter uma seção cirúrgica grosseira, associada à resistência à quimioterapia (principalmente TMZ) (SHI et. al, 2017; FISHER et. al, 2007) e radioterapias (FURNARI et. al, 2007; LIU et. al, 2016). Células iniciadoras de glioma que possuem propriedades semelhantes a células tronco têm sido associadas à resistência à terapia e progressão (HAPPOLD et. al, 2018; WANG et. al, 2017).

O principal mecanismo responsável pela citotoxicidade da TMZ é metilar o DNA nas posições N7 e O6 na guanina, o que leva à falha do sistema de reparo na fita de DNA para encontrar uma base complementar para a guanina metilada resultando em erros no DNA e conseqüentemente bloqueia o ciclo celular na fase G2-M e desencadeia apoptose. Contudo, altos níveis de atividade da metil-guanina-metil-transferase (MGMT) em células tumorais estão associados a fraca resposta à temozolomida. O MGMT é uma proteína crítica de reparo do DNA que protege as células tumorais contra agentes quimioterapêuticos alquilantes.

Diante dos fatores limitantes das terapias ofertadas para o tratamento do GBM e a escassez de agentes terapêuticos eficazes e que possibilitem um melhor prognóstico, novas pesquisas que possibilitem o desenvolvimento de moléculas alvo específicas se tornam essenciais.

O 2-aminoetil Dihidrogeno Fosfato (2-AEH₂F - MFE) é uma molécula envolvida no turnover de fosfolipídios, agindo como um precursor na síntese de alguns fosfolipídios de membrana (EYSTER, 2007). Nosso grupo utiliza o 2-AEH₂F, e vem relatando seus efeitos antiproliferativos em uma ampla variedade de linhagens tumorais. In vivo o 2-AEH₂F exibe efeitos antiproliferativos no modelo de leucemia promielocítica aguda (APL) e leucemia mieloide crônica (K562), células do melanoma

murino B16-F10, para o modelo de carcinoma renal murino RENCA, também apresentando citotoxicidade para células adenocarcinoma de mama humano MCF-7, MDA MB-231, T-47D e hepatocarcinoma murino Hepa1c1c7 (FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2013a; FERREIRA et al., 2013b; MARIA et al., 2014; SILVA, 2016; LUNA et al., 2016; LAVELI-SILVA, 2019; OLIVEIRA, 2019).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos e antiproliferativos de três monofosfoesteres em células de glioblastoma multiforme humano U-138.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultura Celular

Foi utilizada a linhagem tumoral de glioblastoma U-138, originária da ATCC, tendo como código HTB-16™, tendo mantida e estocada no banco de células pelo Dr. Durvanei Augusto Maria (Lab. Biologia Molecular, Instituto Butantan). Após descongelamento as células foram transferidas para garrafa de cultura celular (25 cm²), contendo o meio de cultura DMEM sem fenol vermelho (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com soro fetal bovino 10%, bicarbonato de sódio 200 mM, pH 7,4 em estufa 5% CO₂ à 37°C. As células dispostas em monocamada foram submetidas à dissociação enzimática com solução de tripsina 0,2% + EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) 0,02%, para que ocorra o desprendimento das células. A neutralização enzimática foi feita utilizando o mesmo meio de cultura DMEM contendo 10% SFB. Após a neutralização as células em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 10⁵ células/mL. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão pelo azul de Tripán, sendo considerada ideal para a execução dos experimentos a viabilidade superior a 94%.

2.2 Determinação da atividade citotóxica pelo método MTT

As células tumorais foram incubadas em placas de 96 orifícios a concentração 1x10⁵ células/mL durante 24 e 48 horas e tratadas com o 2-AE₂F em diversas concentrações. Após 24 horas de tratamento o sobrenadante foi coletado em outra placa e adiciona-se 100 µL de MTT (Calbiochem – Darmstadt, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL, as células foram incubadas por 3 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, o conteúdo foi removido e acrescenta-se 100 µL de álcool metílico para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi feita em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm. A concentração que induz toxicidade em 50% das células (IC₅₀) foi determinada no tratamento após 24 e 48 horas em diferentes

concentrações para avaliação do efeito dose-resposta.

2.3 Análises estatísticas

Todos os valores obtidos das diferentes linhagens celulares foram expressos em média \pm desvio médio e após a obtenção dos valores individuais de cada linhagem celular tratada e controle, os resultados serão tabelados e analisados no programa Graphpad, Version 4.0 e InStatPad Prism Version 5.0. A análise dos dados foi realizada pelas comparações de dois ou mais grupos com distribuição não paramétrica utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER, considerando como nível crítico para significância valores de $p < 0.05$.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células tumorais U-138 foram incubadas e tratadas com MFE-1 em concentrações de 0,781 a 200 mM, durante 24 e 48h. Após o tratamento de 24h para o MFE-1, foi observado alterações morfológicas como retração citoplasmática a partir da concentração de 12,5 mM, lise celular, formação de detritos no sobrenadante, perda de adesão e redução da confluência a partir da concentração de 25 mM (Figura 1).

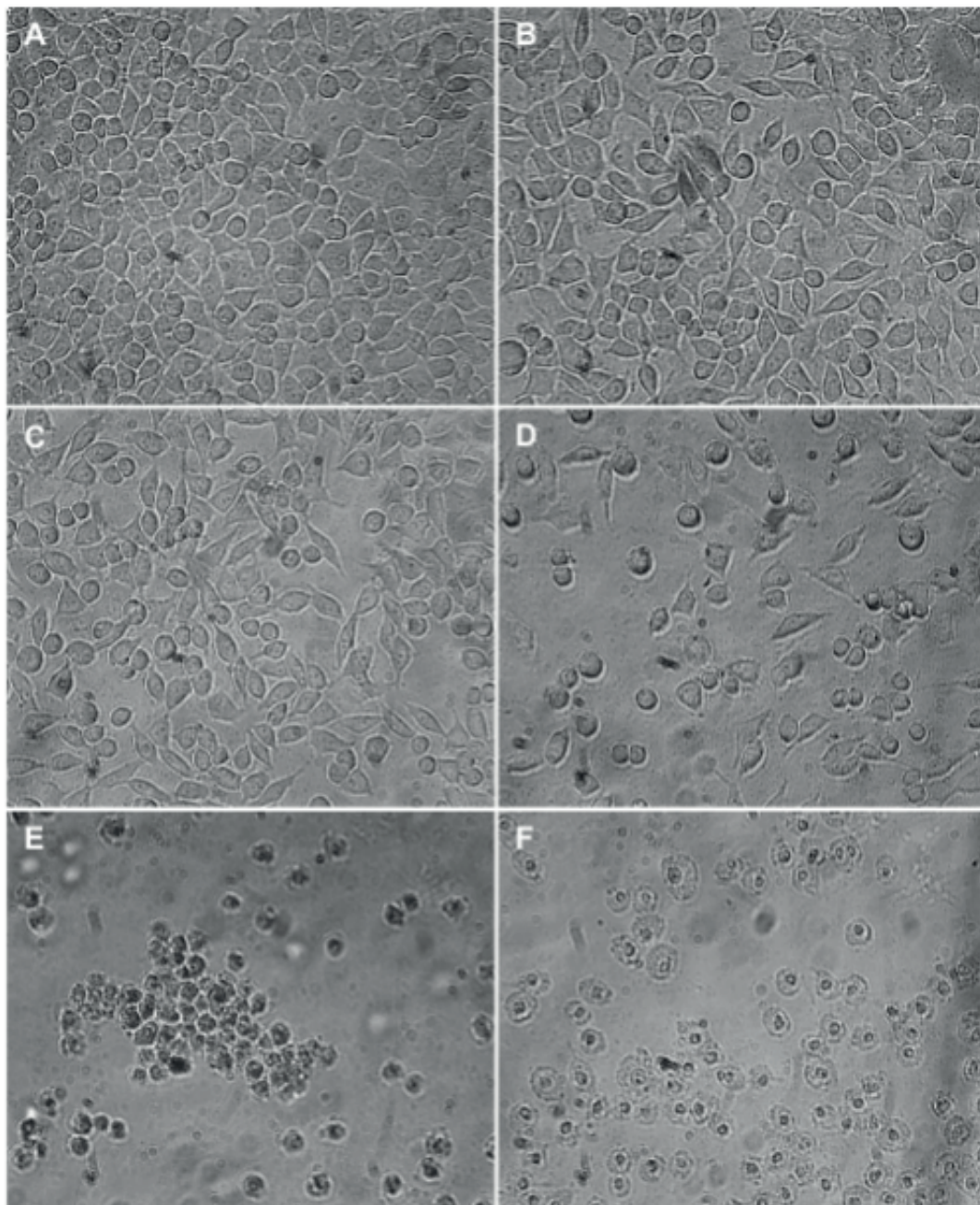


Figura 1. Fotomicrografias das análises morfológicas das células tumorais U-138 tratadas com o MFE-1 no período de 24 horas. (A) Controle (B) 0,781mM (C) 12.5mM (D) 25mM (E) 100mM (F) 200mM.

Após tratamento por 48h, foi observado efeitos citotóxicos com o aumento percentual de morte celular, perda de adesão celular, fragmentação da membrana citoplasmática e perda de progressão dos processos citoplasmáticos (Figura 2). A concentração necessária de MFE-1 para obter a $IC_{50\%}$ foi de 18,16 e 11,6 mM no período de 24 e 48h respectivamente (Figura 3 A-B).

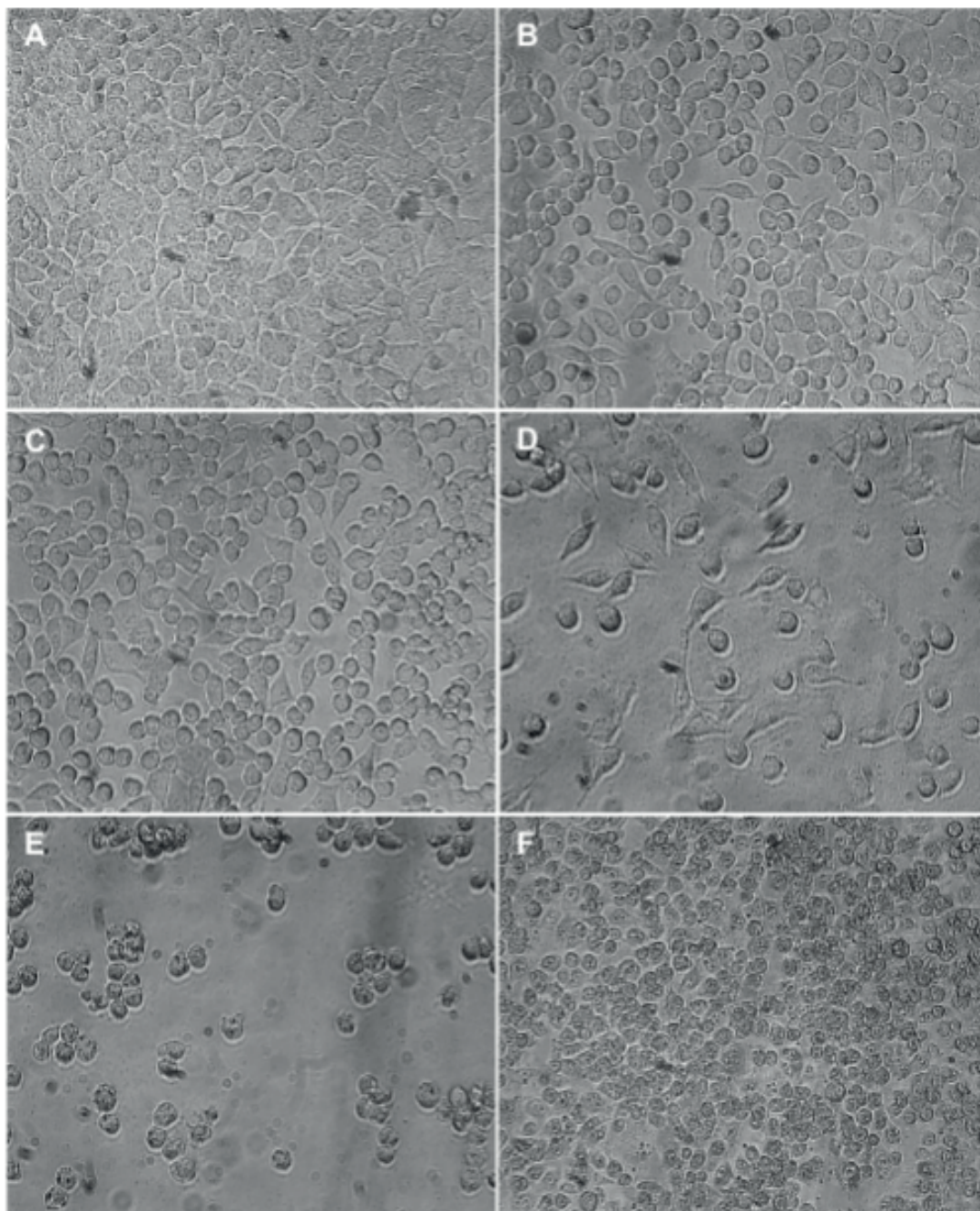


Figura 2. Fotomicrografias das análises morfológicas das células tumorais U-138 tratadas com o MFE-1 no período de 48 horas. (A) Controle (B) 0,781mM (C) 12,5mM (D) 25mM (E) 100mM (F) 200mM.

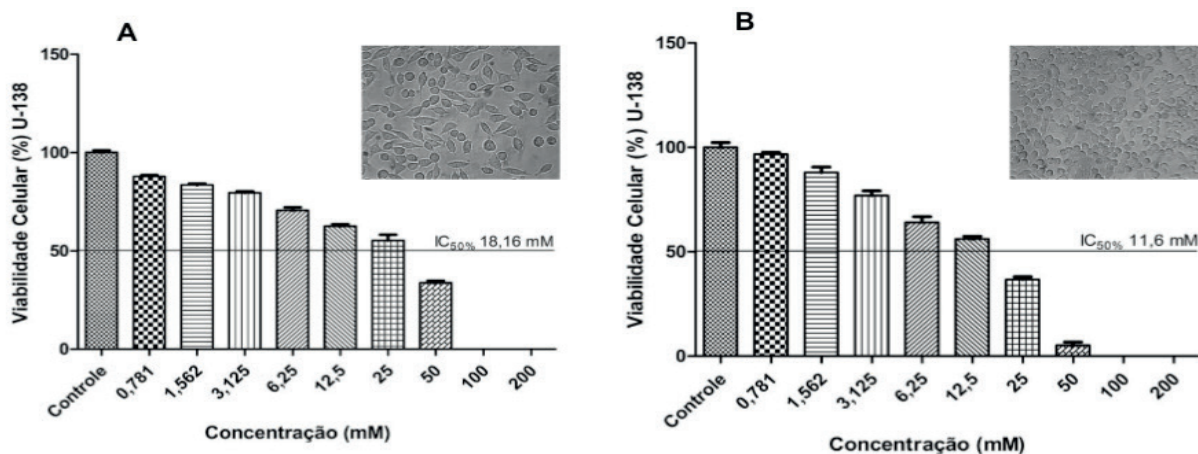


Figura 3. Determinação da citotoxicidade em células tumorais U-138 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média \pm DP de três

experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações do MFE-1 durante o período de 24 e 48 horas. (A) 24h de tratamento (B) 48h de tratamento.

O tratamento com o composto MFE-2 foi observada uma diminuição na densidade celular e um aumento das células com retração citoplasmática e formação de detritos celulares no sobrenadante a partir da concentração de 25mM no período de 24h (Figura 4). O tratamento no período de 48h não apresentou alterações significativas quando comparado com o tratamento de 24h (Figura 5). O valor de $IC_{50\%}$ obtido foi de 30,22 e 25 mM nos períodos de 24 e 48h (Figura 6).

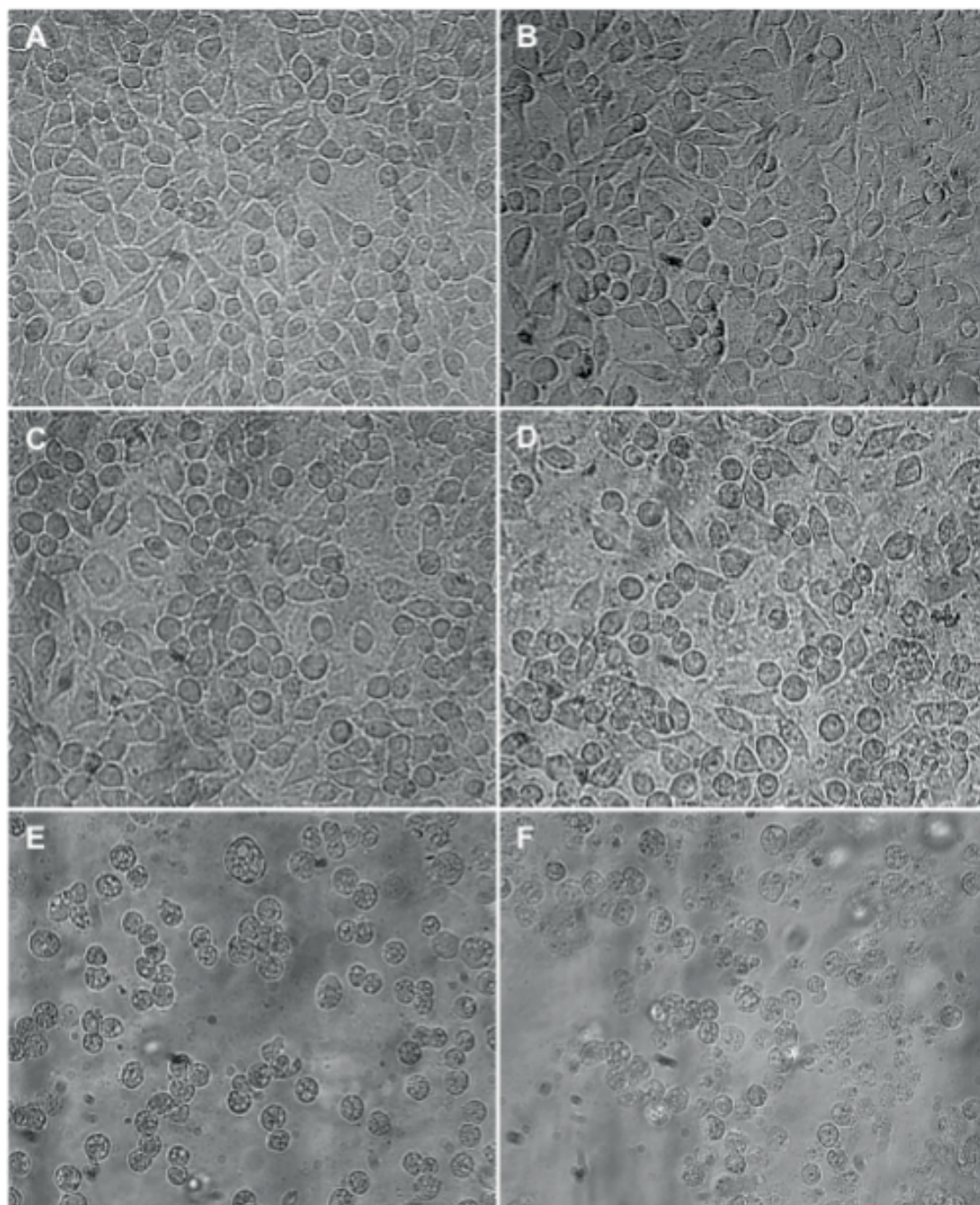


Figura 4. Fotomicrografias das análises morfológicas das células tumorais U-138 tratadas com o MFE-2 no período de 24 horas. (A) Controle (B) 0,781mM (C) 12.5mM (D) 25mM (E) 100mM (F) 200mM.

O composto MFE-3 não apresentou uma efetividade para o tratamento in vitro do GBM. No período de 24 e 48h de tratamento as primeiras alterações morfológicas como retração citoplasmática e lise celular só foi observada na concentração de 100mM (Figura 7). A total inviabilização só foi observada na dose aguada do tratamento na concentração 200 mM, não apresentando citotoxicidade a célula teste. O IC50% obtido para esse composto foi de 76,74 e 67,8 mM no período de 24 e 48h respectivamente (Figura 8).

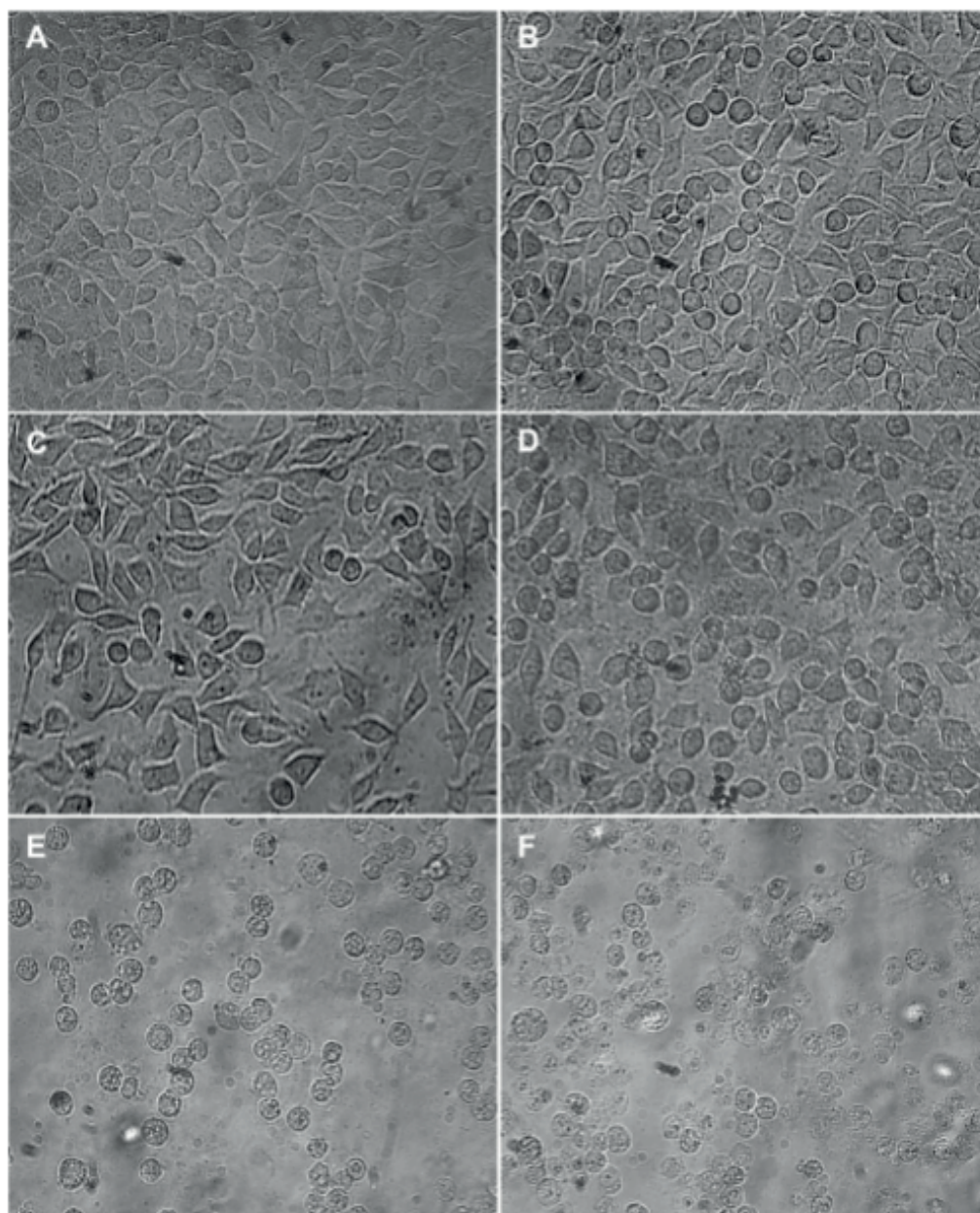


Figura 5. Fotomicrografias das análises morfológicas das células tumorais U-138 tratadas com o MFE-2 no período de 48 horas. (A) Controle (B) 0,781mM (C) 12.5mM (D) 25mM (E) 100mM (F) 200mM.

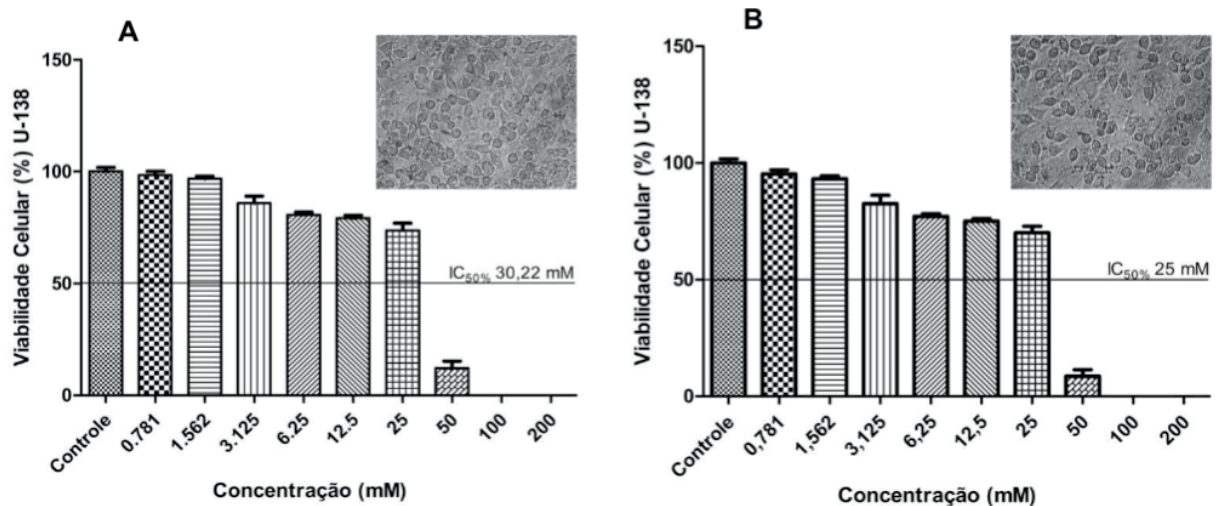


Figura 6. Determinação da citotoxicidade em células tumorais U-138 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média \pm DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações do MFE-2 durante o período de 24 e 48 horas. (A) 24h de tratamento (B) 48h de tratamento.

Quando comparando os compostos em relação a efetividade *in vitro*, sua capacidade antiproliferativa e citotóxica para a célula de glioblastoma multiforme U-138, o MFE-1 apresentou menor $IC_{50\%}$ em ambos os períodos de tratamento, 24 e 48h, em comparação com os demais compostos testados. Pode ser observar claramente nas fotomicrografias as alterações morfológicas causadas pela molécula. O composto MFE-2 apresentou um $IC_{50\%}$ intermediário, não sendo tão específico quanto o primeiro, resultado obtido devido a composição e a distribuição das moléculas contidas na solução, levando em conta o grau de pureza do composto. O composto MFE-3 não apresentou um resultado significativo, obtendo um $IC_{50\%}$ 4 vezes maior que o monofosfoester 1 no período de 24h e aproximadamente 6 vezes maior quando comparando o valor obtido para o período de 48h (Figura 9).

Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo, onde a viabilidade celular avaliada após o período de 24h mostrou redução da viabilidade celular dependendo da concentração e do tempo para células de triplo negativo humano e leucemia mielóide crônica (LAVELI-SILVA et al., 2019 e Oliveira et al., 2019).

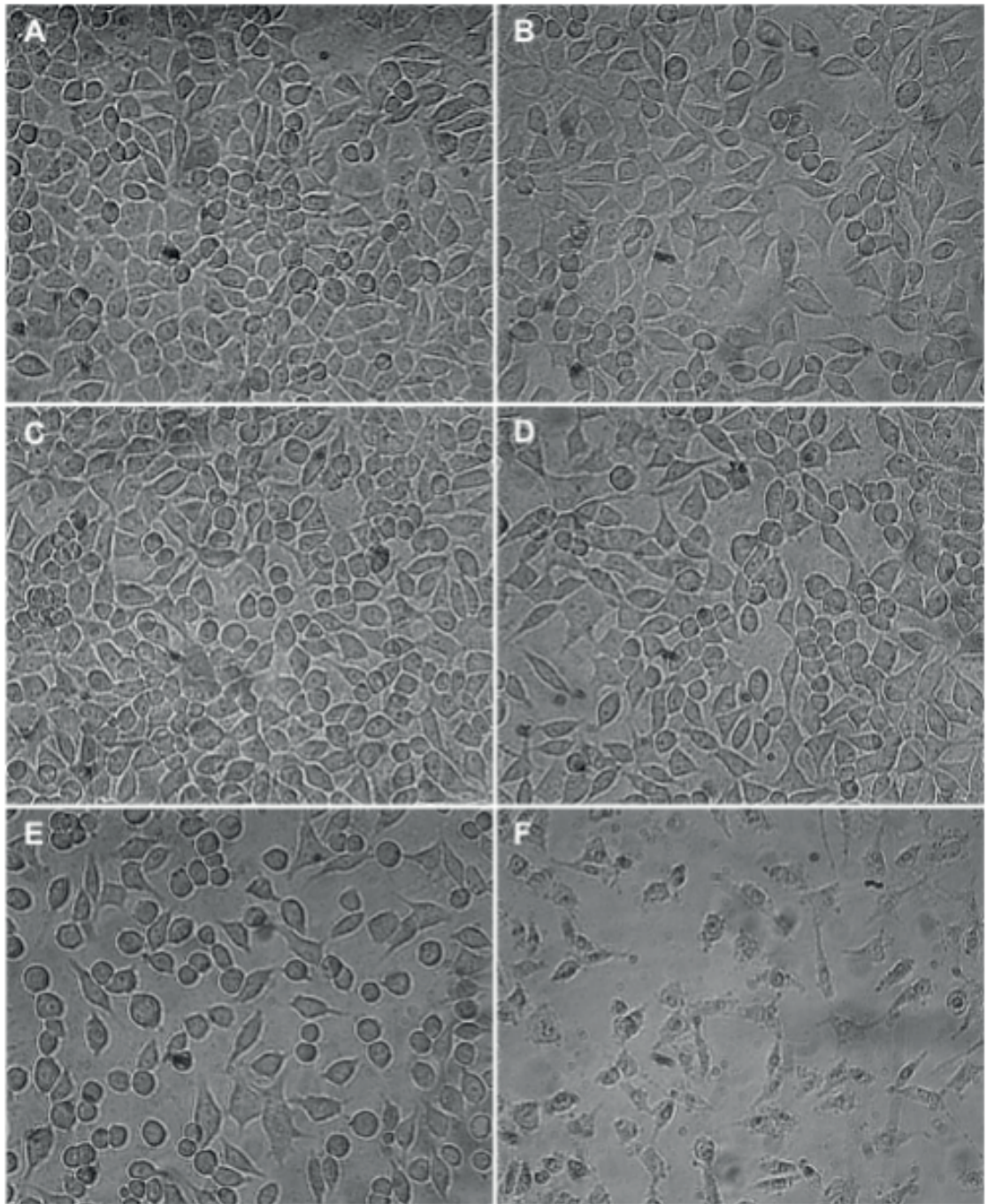


Figura 7. Fotomicrografias das análises morfológicas das células tumorais U-138 tratadas com o MFE-3 no período de 24 horas. (A) Controle (B) 0,781mM (C) 12.5mM (D) 25mM (E) 100mM (F) 200mM.

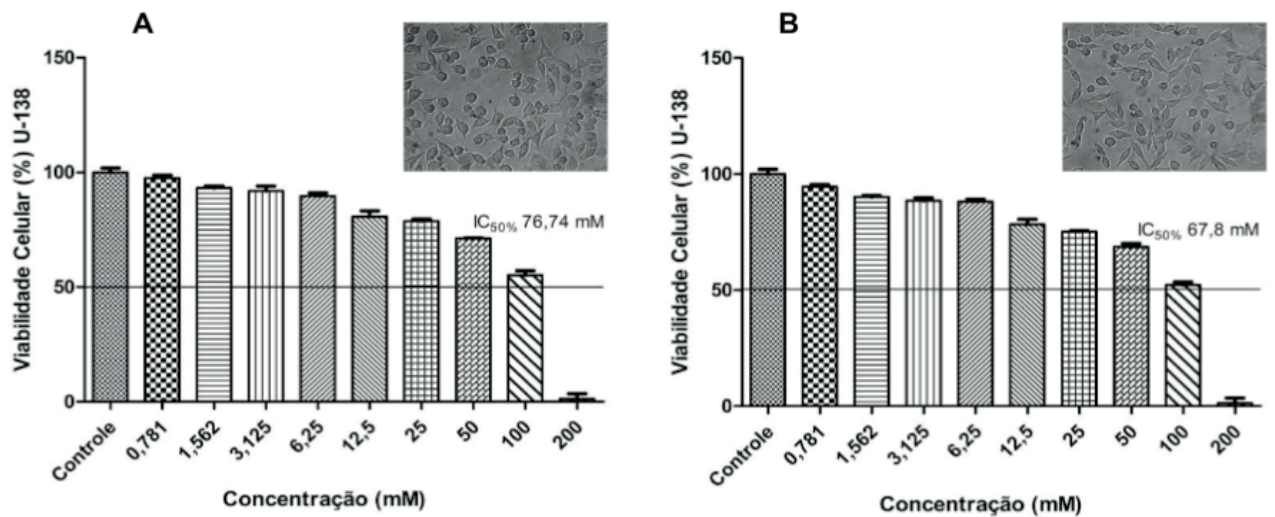


Figura 8. Determinação da citotoxicidade em células tumorais U-138 pelo método colorimétrico MTT. O gráfico mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média \pm DP de três experimentos independentes. As células foram tratadas com diferentes concentrações do MFE-3 durante o período de 24 e 48 horas. (A) 24h de tratamento (B) 48h de tratamento.

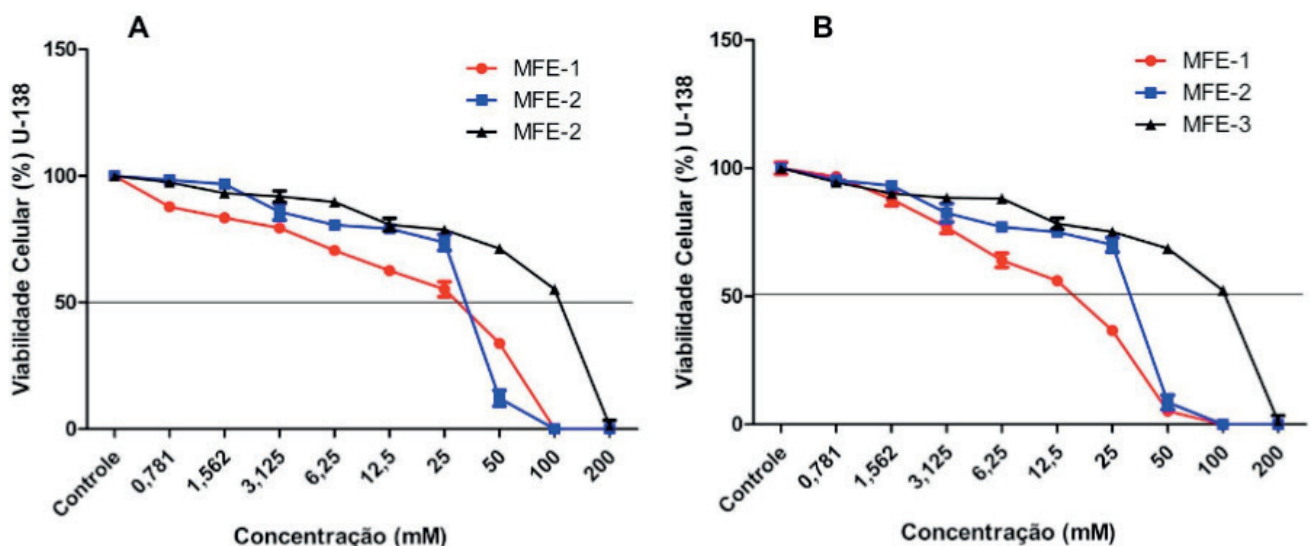


Figura 9. Determinação da citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT. O gráfico comparativo mostra a correlação do efeito citotóxico expresso em média \pm DP de três experimentos independentes. Tratamentos em diferentes concentrações no período de 24 e 48 horas de MFE distintos. (A) Comparativo no período de 24h (B) Comparativo no período de 48h.

Vários estudos foram publicados mostrando que os fosfolipídios antineoplásicos atuam nas membranas celulares dos tumores, interferindo na renovação dos fosfolipídios em contraste com os quimioterápicos convencionais. Esse processo ocorre devido à sua estabilidade, na qual suas ligações não são metabolizadas e podem interferir nos lipídios sinalizadores, causando apoptose em células tumorais malignas (VANBLITTERSWJIK et al., 2008).

O monofosfoester (MFE) foi citotóxico para todas as linhagens celulares tumorais estudadas pelo nosso grupo de pesquisa: EAT (tumor de Ehrlich ascites); Células B16F10 (melanoma murino); Células MCF7 (adenocarcinoma de mama humano); Células H292 (câncer de pulmão); Células SKMEL-28, MEWO

(melanoma humano), MDA MB-231 (triplo negativo humano) e K562 (Leucemia mielóide crônica). Além disso, o tratamento com monofosfoester não foi citotóxico para células normais, como fibroblastos e células endoteliais (FERREIRA et al., 2012; FERREIRA et al., 2013a; FERREIRA et al., 2013b; LAVELI-SILVA et al., 2017; LAVELI-SILVA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019) . Os resultados dos ensaios de citotoxicidade indicam que o monofosfoester promove seus efeitos antitumorais por meio de um mecanismo que parece ser comum a todas as células sem promover efeitos citotóxicos significativos nas células normais.

4 | CONCLUSÃO

O tratamento típico para glioblastoma envolve ressecção cirúrgica da massa tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia. No entanto, essas terapias geralmente são ineficazes dadas à alta taxa de recidiva, o aparecimento geral de resistência ao tumor ao longo do tempo, associado a uma grave deterioração neurológica do paciente. Neste estudo um novo potencial terapêutico com os monofosfoesteres para células de glioblastoma multiforme humano U-138, os quais apresentam efeitos apoptótico, citotóxico e antiproliferativo seletivos independentemente do perfil de resistência que a célula apresenta a terapia existente.

REFERÊNCIAS

Chinot OL, Wick W, Cloughesy T. **Bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma.** N Engl J Med. 2014;370:2049. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24860870>.

Conceição, T. O., Laveli-silva, M. G., Maria, D. A. **Phosphomonoester Phosphoethanolamine Induces Apoptosis in Human Chronic Myeloid Leukemia Cells.** Journal of Pharmacy and Pharmacology 7 (2019) 434-450. doi: 10.17265/2328-2150/2019.07.009

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

Eyster, K. M. **The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist.** AJP: Advances in Physiology Education, v. 31, n. 1, p. 5–16, 2007.

Ferreira, A. K., Meneguelo, R., Marques, F. L. N., Randin, A., Mendonça, O., Neto, S. C., Chierice, G. O., and Maria, D. A. 2012. **“Synthetic Phosphoethanolamine: A Precursor of Membrane Phospholipids Reduce Tumor Growth in Mice Bearing Melanoma B16-F10 and in Vitro Induce Apoptosis and Arrest in G2/M Phase.”** Biomedicine & Pharmacotherapy 66 (7): 541-8.

Ferreira, A. K., Meneguelo, R., Pereira, A., Mendonça, O., Chierice, G. O., and Maria, D. A. 2013. **“Synthetic Phosphoethanolamine Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through the Mitochondrial Pathway.”** Biomedicine & Pharmacotherapy 67: 481-7.

Ferreira, A. K., Santana-Lemos, B. A. A., Rego, E. M., Filho, O. M. R., Chierice, G. O., and Maria, D. A. 2013. **"Synthetic Phosphoethanolamine Has in Vitro and in Vivo Anti-leukemia Effects."** British Journal of Cancer 109: 2819-28.

Ferreira, A. K., Meneguelo, R., Pereira, A., Filho, O. M. R., Chierice, G. O., and Maria, D. A. 2012. **"Anticancer Effects of Synthetic Phosphoethanolamine on Ehrlich Ascites Tumor: An Experimental Study."** Anticancer Research 32: 95-104.

Ferreira, A. K., Freitas, V. M., Levy, D., Ruiz, J. L., Bydlowski, S. P., Rici, R. E., Filho, O. M., Chierice, G. O., and Maria, D. A. 2013. **"Anti-angiogenic and Anti-metastatic Activity of Synthetic Phosphoethanolamine."** PLoS One 8: 57937

Fisher T, Galanti G, Lavie G, Jacob-Hirsch J, Kventsel I, Zeligson S, Winkler R, Simon AJ, Amariglio N, and Rechavi G, et al (2007). **Mechanisms operative in the antitumor activity of temozolomide in glioblastoma multiforme.** Cancer J 13, 335–344.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, and Brennan C, et al (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev 21, 2683–2710.

Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, et al. **A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma.** N Engl J Med. 2014;370:699–708. doi: 10.1056/NEJMoa130857

Happold C, Stojcheva N, Silginer M, Weiss T, Roth P, Reifenberger G, and Weller M (2018). **Transcriptional control of O6-methylguanine DNA methyltransferase expression and temozolomide resistance in glioblastoma.** J Neurochem 144(6), 780–790.

Laveli-Silva, M. G. 2017. **"Antitumor Evaluation of Synthetic Phosphoethanolamine and Liposomal Formulation DODAC/Synthetic Phosphoethanolamine in Human Breast Tumor Cells."** Master's thesis, University of Sao Paulo. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-11052017-142120/pt-br.php>.

Lai SW, Huang BR, Liu YS, Lin HY, Chen CC, Tsai CF, Lu DY, and Lin C (2018). **Differential characterization of temozolomide-resistant human glioma cells.** Int J Mol Sci 19(1).

Liu ZG, Jiang G, Tang J, Wang H, Feng G, Chen F, Tu Z, Liu G, Zhao Y, and Peng MJ, et al (2016). **c-Fos over-expression promotes radioresistance and predicts poor prognosis in malignant glioma.** Oncotarget 7(40), 65946.

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

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan. **CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011.** J Neuro Oncol. 2014 Oct; 16 Suppl 4():iv1-63.

Shi J, Dong B, Zhou P, Guan W, and Peng Y (2017). **Functional network analysis of gene-phenotype connectivity associated with temozolomide.** Oncotarget 8(50), 87554–87567.

Taal W, Oosterkamp HM, Walenkamp AM, Dubbink HJ, Beerepoot LV, Hanse MC, Buter J, Honkoop AH, Boerman D, de Vos FY, Dinjens WN, Enting RH, Taphoorn MJ, et al. **Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial.** Lancet Oncol. 2014;15:943–53. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70314-6.

VanBlitterswijk, W. J., and Verheij, M. 2008. “**Anticancer Alkylphospholipids: Mechanisms of Action, Cellular Sensitivity and Resistance, and Clinical Prospects.**” *Curr Pharm Des.* 14: 2061-74

Wang Z, Xu X, Liu N, Cheng Y, Jin W, Zhang P, Wang X, Yang H, Liu H, and Tu Y (2017). **SOX9-PDK1 axis is essential for glioma stem cell self-renewal and temozolomide resistance.** *Oncotarget* 9(1), 192–204.