

Universidade De São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências E Letras De Ribeirão Preto
Departamento De Biologia

**“Efeitos *in vitro* da inibição do NF-KappaB na quimio- e
radiatorresistência em linhagens celulares de glioblastoma”**

Lara Elis Alberici Delsin

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ribeirão Preto – SP
2013

Universidade De São Paulo
Faculdade De Filosofia, Ciências E Letras De Ribeirão Preto
Departamento De Biologia

**“Efeitos *in vitro* da inibição do NF-KappaB na quimio- e
radiatorresistência em linhagens celulares de glioblastoma”**

Lara Elis Alberici Delsin

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. María Sol Brassesco Annichini

Ribeirão Preto – SP
2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Delsin, Lara Elis Alberici

Efeitos *in vitro* da inibição do NF-KappaB na quimio- e radiorresistência em linhagens celulares de glioblastoma. Ribeirão Preto, 2013

Monografia apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética

Orientadora: Brassesco Annichini, María Sol

1. Glioblastoma. 2. DHMEQ. 3. NF-kappaB.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lara Elis Alberici Delsin

**“Efeitos *in vitro* da inibição do NF-KappaB na quimio- e
radiatorresistência em linhagens celulares de glioblastoma”**

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Genética

Data da defesa:

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2010/50635-4 e processo nº 2011/21463-3).
- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.

Dedico este trabalho aos meus pais, George e Sílvia, que me ensinaram desde a pré-escola a valorizar o conhecimento e me proporcionaram a melhor orientação, além de apoio e amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por nunca desistir de mim nos momentos em que me faltou fé.

Aos meus **Pais**, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando.

A minha orientadora **Profa. Dra. María Sol Brassesco Annichini**, não apenas pela excelente orientação profissional, mas por todo apoio que me deu, pela confiança depositada em mim e por todos os momentos agradáveis que passamos juntas. Você colaborou para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada!

As minhas amigas **Gabriela Molinari Roberto** e **Lenisa Geron**, por compartilharem comigo todos, melhores e piores, momentos da graduação.

Ao **Gustavo Borges**, por me entender, me apoiar e me abraçar sempre que precisei.

As minhas eternas amigas **Nayra, Elisa, Fernanda, Nathália e Bruna** por me ajudarem a construir a pessoa que sou hoje.

As pós-graduandas **Julia Alejandra Pezuk, Paola Fernanda Fedatto, Silvinha Teixeira**, e a **Prof^a Jaqueline Carvalho de Oliveira**, por serem todas minhas co-orientadoras não oficiais, mas de coração.

A todos os amigos do laboratório **Augusto, Andressa, Kleiton, Gustavo, Maurício, Mayara, Marcela, Mirella, Pâmela, Priscila, Régia, Rosane, Vanessa e Veridiana**, pela amizade e por sempre me ajudarem, contribuindo para o meu aprendizado.

Ao **Prof.^o Dr. Luiz Gonzaga Tone** que colaborou para meu crescimento profissional e deu estrutura para o desenvolvimento do trabalho.

Às técnicas do laboratório de Citogenética do Departamento de Puericultura e Pediatria **Aide Barbosa, Sônia Scandussi**, e **Lucimar Fernandes Laureano** e às secretárias do Laboratório de Puericultura e Pediatria **Evelice Visconte e Helena Blanco** pelo apoio e convivência.

À **Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Ao **Departamento Financeiro da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP/USP)** pelo auxílio financeiro.

Ao **Departamento de Puericultura e Pediatria** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio prestado **aos Laboratórios de Citogenética e Biologia Molecular**, onde realizei meus experimentos.

A **todos** que de algum modo me apoiaram e contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta
ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

“Efeitos *in vitro* da inibição do NF-KappaB na quimio- e radiorresistência em linhagens celulares de glioblastoma.”

O glioblastoma é um tumor maligno que acomete os hemisférios cerebrais e se caracteriza por ser um dos tipos mais agressivos e frequentes. Depois de diagnosticado o paciente tem uma sobrevida de 12 a 18 meses, o que deixa claro a baixa eficiência das terapias convencionais. Esta situação desfavorável é resultado da resposta tumoral a estes tratamentos, na qual as células ativam mecanismos anti-apoptóticos, de quimiorresistência, de invasão e proliferação, o que sobrepuja tanto a remoção cirúrgica quanto os tratamentos convencionais (radio- e quimioterapia). Vários desses mecanismos ativados durante o tratamento são, ao menos em parte, controlados por um único fator de transcrição: o NF-kappaB, o que leva a inferir que ao ser bloqueado, a sensibilidade celular à terapia será aumentada. Recentemente foi descoberto um inibidor deste fator de interesse, o DHMEQ (deidroxi metilepoxiquinomicina), que atua no bloqueio da translocação do NF-kappaB para o núcleo, impedindo assim a sua ativação transcricional.

Dessa forma, no projeto em questão foram testados os efeitos *in vitro* desta nova droga, em linhagens celulares adultas (T98G e U138-MG) e pediátricas (SF188 e KNS-42) de glioblastoma, através de experimentos que mensuram a expressão gênica e a resposta celular quando combinada à radiação ionizante e aos quimioterápicos mais convencionais (Temozolomida e Etoposide). Os resultados obtidos mostraram uma ação quimio- e radiosensibilizante nas linhagens (inclusive naquelas consideradas resistentes) quando o DHMEQ foi aplicado de modo sequencial, indicando sinergia entre os tratamentos. Também se verificou a diminuição nos níveis de expressão do gene *MGMT* responsável pela resistência ao tratamento com agentes alquilantes. Com base nesses resultados e em dados da literatura, podemos concluir que o NF-kappaB é um alvo terapêutico promissor e que o DHMEQ é um quimioterápico sensibilizante com possibilidade futura de uso clínico.

Palavras-chave: Glioblastoma, DHMEQ, NF-kappaB.

ABSTRACT

“In vitro effects of NF-kappaB inhibition in chemo-and radioresistance in glioblastoma cell lines.”

Glioblastoma is one of the most aggressive and frequent primary brain tumor commonly found in the cerebral hemispheres. The prognosis is still dismal with median survival of 12 to 18 months, demonstrating the low efficiency of current therapeutic approaches. This unfavorable situation is reinforced through the tumor mechanisms of anti-apoptosis, chemoresistance, invasion and proliferation, which evade surgical removal and traditional treatments (radio- and chemotherapy). The resistance mechanisms activated during the cell response are in part, controlled by a unique transcription factor: the NF-kappaB. Recently, a specific inhibitor of this factor was discovered, DHMEQ (dehydroxymethylepoxyquinomicin), which acts blocking the nuclear translocation of NF-kappaB, preventing its transcriptional activation.

In the present study, the *in vitro* effects of DHMEQ were tested on different adult (T98G and U138-MG) and pediatric (SF188 and KNS-42) glioblastoma cell lines, through experiments that measure gene expression and the drug effects when associated with irradiation and conventional chemotherapeutics (temozolomide and Etoposide). The results evidenced chemo- and radiosensitizing effects of DHMEQ in all cell lines (including the resistant ones), mainly when the inhibitor was administrated in a sequential schedule. Furthermore, a decreased expression of the repair gene *MGMT*, responsible for the resistance to alkylating agents, was verified. Based on these results and literature, we can conclude that NF-kappaB might be a promising therapeutic target and DHMEQ a sensitizing chemotherapeutic with future possibilities of clinical application.

Keywords: Glioblastoma, DHMEQ, NF-kappaB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do DHMEQ.....	26
Figura 2: Estrutura molecular da TMZ	27
Figura 3: Estrutura molecular do VP-16	27
Figura 4: Dinâmica de expressão de genes relacionados a resistência a drogas em linhagens de GBM após tratamento com DHMEQ.....	35
Figura 5: Valores do Momento da Cauda para tratamentos sequenciais de DHMEQ e TMZ nas linhagens de GBM adulto.....	36
Figura 6: Fração de Sobrevivência de quatro linhagens celulares no ensaio de proliferação sob tratamento com TMZ pura (isolada) (a), e tratamentos combinados de modo concomitante (b) e sequencial (c) ao DHMEQ.....	39
Figura 7: Fração de Sobrevivência de quatro linhagens celulares no ensaio de proliferação sob tratamento com VP-16 pura (isolada) (a), e tratamentos combinados de modo concomitante (b) e sequencial (c) ao DHMEQ.....	41
Figura 8: Ensaio de sobrevivência clonogênica de linhagens de glioblastoma irradiadas com 2, 4 e 6 Gy e células pré-tratadas com 10 µg/mL de DHMEQ antes da irradiação com as mesmas doses	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela I:** Valores do Índice de Combinação (CI) e Índice de Redução de Dose (DRI) para a combinação de modo concomitante e sequencial de DHMEQ e TMZ.....40
- Tabela II:** Valores do Índice de Combinação (CI) e Índice de Redução de Dose (DRI) para a combinação de modo concomitante e sequencial de DHMEQ e VP-1642
- Tabela III:** Valores da Taxa de Redução de Dose (DER) obtidos a partir do pré-tratamento com DHMEQ e irradiação com três diferentes doses44

LISTA DE SIGLAS

ABC	<i>ATP Binding Cassette Family</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BER	<i>Base Excision Repair</i>
DER	<i>Dose Enhancement Ratio</i> (Taxa de Redução de Dose)
DHMEQ	Inibidor de NF-kappaB (Deidroximetilepoxiquinomicina)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRI	Índice de Redução de Dose
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	Eficiência de Plaqueamento
FS	Fração de Sobrevivência
GBM	Glioblastoma
HAM F-10	Solução Nutritiva para o Cultivo Celular
CI	<i>Combination Index</i> (Índice de Combinação)
KNS-42	Linhagem celular de Glioblastoma Pediátrico
MDR	Fenótipo Celular de Resistência a Multidrogas
MEM	Solução Nutritiva para o Cultivo Celular
MGMT	O6-metilguanina-DNA-metiltransferase
MMR	Via de Reparo tipo <i>Mismatch</i>
MRP	<i>Multidrug Resistance Associated Protein</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
P-gp	Glicoproteína-P
PBS	Tampão salina fosfato
RT	Radioterapia
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
SBF	Soro Bovino Fetal
SF188	Linhagem celular de Glioblastoma Pediátrico
SNC	Sistema Nervoso Central
T98G	Linhagem celular de Glioblastoma Adulto
TMZ	Quimioterápico Temozolomida
Topo II	Topoisomerase II
U138-MG	Linhagem celular de Glioblastoma Adulto
VP-16	Quimioterápico Etoposide

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Gy	Grey
L	Litros
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanometro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
rpm	Rotações por minuto
γ	Gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Linhagens Celulares e Condições de Cultura.....	26
3.2. Drogas	26
3.3. Extração de mRNA e Análise da expressão Gênica por RT-Qpcr.....	27
3.4. Ensaio do Cometa.....	28
3.5. Ensaio de Proliferação Celular	29
3.5.1. Coloração com Giemsa	29
3.5.2. Combinação entre os quimioterápicos.....	30
3.6. Ensaio Clonogênico após Irradiação.....	30
3.7. Análise Estatística	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Expressão Gênica de <i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> , <i>BCRP</i> e <i>MGMT</i> em linhagens celulares de glioblastoma	34
4.2. DHMEQ potencializa ação Clastogênica da TMZ	35
4.3. DHMEQ sensibiliza linhagens de glioblastoma a diferentes quimioterápicos	37
4.4. DHMEQ sensibiliza linhagens de glioblastoma a radiação ionizante	42
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

Introdução

O Glioblastoma (GBM), ou Astrocitoma grau IV, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), representa 12-15% de todos os tumores cerebrais e 50-70% dos gliomas malignos. Este tumor é altamente agressivo, e neurologicamente destrutivo, sendo considerado uma das neoplasias humanas mais letais (Louis *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2012). A doença acomete mais adultos que crianças, com pico de incidência entre 45 e 70 anos, sendo 1,5 vezes mais comum em homens (Ferguson, 2011; Brandes, 2008). O GBM pode se desenvolver em qualquer região do sistema nervoso central (SNC), mas acomete principalmente os hemisférios cerebrais, emergindo de células intrínsecas deste sistema ou das meninges (Ferguson, 2011).

Os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes podem incluir dores de cabeça progressivas (em cerca de 50% dos casos), deficiências neurológicas, náuseas e convulsões. Provavelmente como resultado do aumento da pressão intracraniana, hidrocefalia, edemas ou hemorragias (Ferguson, 2011; Lima *et al.*, 2012).

Os GBM podem surgir de dois modos, sendo classificados em primários (ou *de novo*) e secundários. Os primários se formam muito rapidamente sem que haja evidência de precursores, representando 90% dos casos; os GBM secundários por outro lado, progridem de tumores com menor nível de malignidade, como Astrocitomas difusos (grau II segundo a OMS) ou Astrocitomas anaplásticos (grau III segundo a OMS), aparecendo com menor frequência. Apesar de não apresentarem diferenças morfológicas evidentes, eles se desenvolvem a partir de vias genéticas diferentes (Ohgaki & Kleihues, 2009).

Durante o desenvolvimento dos GBM primários ocorrem alterações genéticas, dentre elas amplificação do *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) em cerca de 40% dos casos, e em 15 a 40% observa-se mutação no *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*). Nos glioblastomas secundários são mais evidentes mutações no gene *TP53* (*tumor protein 53*), observado em cerca de 68% dos casos, além de alterações no *TGF- β* (*transforming growth factor beta*), que gera um alça de retroalimentação autócrina para estimulação do crescimento, e amplificação/superexpressão do *PDGFR* (*platelet-derived growth factor receptor*). Em aproximadamente 50% dos glioblastomas primários e em mais de 70% dos secundários podem ser observadas mutações ao menos em um dos genes *TP53*, *MDM2* (*murine double minute 2*) ou *p14arf* (*protein 14 alternate reading frame*), que por estarem na mesma via, estão relacionados a alterações no ciclo celular em resposta a danos no DNA, morte e diferenciação celular. Outras alterações genéticas também podem ocorrer principalmente relacionadas ao gene *RB* (*retinoblastoma*), cuja alteração culmina em progressão desregulada do ciclo celular (Ohgaki & Kleihues, 2009; Lima, 2012).

Ainda, este tipo de tumor maligno exibe um perfil genético heterogêneo, tanto entre células de um único tumor quanto entre tumores (Kerasi, 2011). As principais características histo- e citopatológicas do GBM são necrose, neo-angiogênese, atipia nuclear, aberrações cromossômicas, crescimento desregulado, mecanismos de anti-apoptose, tendência à infiltração difusa e migração; o que somados geram uma grande propensão à resistência às terapias convencionais (Zhang *et al.*, 2011; Ferguson, 2011; Kesari, 2011).

O procedimento terapêutico padrão se inicia com a ressecção cirúrgica do tumor, que visa minimizar os efeitos que a massa tumoral gera, entretanto trata-se de um procedimento controverso em gliomas malignos. Em outros campos da oncologia, a cirurgia representa um procedimento de controle da doença, porém os GBM apresentam uma alta capacidade invasiva e margens pouco definidas, o que dificulta a ressecção completa e culmina em aumento das recidivas. Além disso, a máxima ressecção não é possível devido à proximidade a áreas críticas, podendo gerar complicações neurológicas e necrose (Hentschel & Sawaya, 2003; Iacob & Dinca, 2009; Ferguson, 2011; Lima *et al.*, 2012).

Além da ressecção cirúrgica, a radioterapia também é aplicada no tratamento de casos de gliomas malignos; essa se baseia no dano que a radiação ionizante causa no DNA por elétrons e geração de radicais livres (Iacob & Dinca, 2009). Com o advento da radioterapia a sobrevivência média dos pacientes passou de três meses, apenas com o procedimento cirúrgico, para oito meses (Tran & Rosenthal, 2010). Em 2005, a Organização Europeia de Pesquisa para Tratamento do Câncer (EORTC) e o Instituto Nacional do Câncer do Canadá (NCIC) demonstraram a eficácia no tratamento concomitante e adjuvante do agente alquilante Temozolomida (TMZ) (Perry *et al.*, 2012). Sendo assim, o tratamento padrão utilizado atualmente consiste em máxima remoção cirúrgica, visando aliviar os sintomas de hipertensão cranial gerados pela massa celular, seguida de radio- e quimioterapia concomitantes e tratamento adjuvante de seis meses apenas com o quimioterápico TMZ (Brandes *et al.*, 2008; Khasraw & Lassman, 2010).

A TMZ é uma pró-droga que ao ser metabolizada pela célula libera o íon metildiazônio, que é altamente reativo. Este metabólito é um agente capaz de metilar o DNA gerando os seguintes produtos: N⁷-metilguanina, O⁶-metilguanina e N³-metiladenina. Apesar do primeiro ser o mais produzido (70%), o produto mais tóxico é o O⁶-metilguanina, pois provoca o pareamento errado de uma timina com uma guanina metilada durante a replicação, resultando em O⁶MeG/T, que é reconhecido pelo sistema de reparo *mismatch* (MMR). Tal mecanismo tenta improdutivamente reparar esse pareamento por vários ciclos, o que gera lesões secundárias e acaba por bloquear a próxima replicação do DNA, levando eventualmente

a quebras de dupla fita e indução da via apoptótica (Chalmers *et al.*, 2009; Knizhnik *et al.*, 2013).

Entretanto, apesar do progresso tecnológico na medicina e avanço das pesquisas, o tratamento padrão ainda apresenta baixa eficácia, acarretando em um péssimo prognóstico, com uma sobrevida média dos pacientes entre 12 e 18 meses (Ferguson, 2011; Lima *et al.*, 2012).

Umas das razões para tal ineficácia do tratamento é a alta quimiorresistência dos GBM. O dano causado pela TMZ, por exemplo, pode ser eficientemente revertido pela enzima MGMT (O⁶-metilguanina metiltransferase) que age transferindo o grupamento alquil/metil do átomo O⁶ da guanina do DNA para seus próprios resíduos de cisteína, inativando irreversivelmente a proteína MGMT e restaurando a guanina do DNA, inviabilizando deste modo o tratamento. Por outro lado, em tumores cujas ilhas CpG presentes no promotor do gene *MGMT* estão metiladas, tal gene é silenciado, e desta maneira não ocorre o mecanismo de reparo, fazendo com que o tratamento seja mais efetivo, conferindo ao paciente melhor prognóstico (Lavon *et al.*, 2007; Chalmers *et al.*, 2009). Esta situação favorável é verificada em cerca de 40% dos GBM, nos quais a resposta à quimioterapia através da ação da TMZ é mais eficiente, e os pacientes chegam a atingir uma sobrevida de, em média, 10 meses a mais do que os casos onde o GBM não possui o promotor de *MGMT* hipermetilado (Kesari, 2011).

O tratamento em casos pediátricos é ainda mais desapontador, pois estes apresentam maior resistência à TMZ que nos pacientes adultos. Uma das possíveis explicações para este fato foi descrita no trabalho de Ezaki *et al.*, 2011, no qual os pesquisadores demonstraram que os gliomas pediátricos apresentaram expressão de *MGMT* significativamente mais alta que gliomas adultos, além de menor metilação do promotor do *MGMT*. Além disso, outros estudos já comprovaram que a resistência em linhagens de GBM pediátrico pode também estar relacionada a mecanismos independentes da expressão de *MGMT*, como o caso da linhagem KNS-42, cuja resistência se mostrou relacionada a altos níveis de expressão dos genes *HOXA9/HOXA10* (Gaspar *et al.*, 2010). Sendo assim, para casos pediátricos que apresentam alta resistência ao tratamento tradicional, outras drogas, como Vincristina (Felix *et al.*, 2011), Nimotuzumab (Cabanas *et al.*, 2013), ou uma combinação de diversas drogas, como no protocolo HIT-gBM-c (Wolff *et al.*, 2010) entre outras, são utilizadas, sem que haja um protocolo padrão a ser seguido.

Nos casos de reincidência do tumor, o quimioterápico estabelecido como de segunda ou terceira linha é também o Etoposide (VP-16) (Watanabe *et al.*, 2002). Trata-se de um quimioterápico sintético capaz de inibir a proteína Topoisomerase II, altamente utilizado como

antineoplásico em diversos tipos tumorais, como leucemia mieloide aguda, câncer gástrico, câncer de mama, entre outros (Hande, 1998).

Paralelamente, na literatura constam diversas vias alternativas à do MGMT que também levam a resistência tumoral. Estudos já demonstraram que alguns tumores que exibem uma baixa expressão de MGMT podem também exibir alta resistência por apresentarem mutações no gene *TP53*, super-expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-X_L, ativação dos mecanismos de invasão (através da produção de gelatinases da família MMP), proliferação (regulação do ciclo celular) e angiogênese (pela expressão de VEGF e IL-8) (Spiller *et al.*, 2011). Além destes, é conhecida também a ativação da via BER (*base excision repair*), que repara as N⁷-metilguanina inseridos no DNA pela TMZ, diminuindo a citotoxicidade deste quimioterápico (Trivedi *et al.*, 2005; Gaspar *et al.*, 2010). Em conjunto, estes estudos ressaltam que várias outras vias e genes podem ser responsáveis pela pequena eficiência do tratamento, não somente o MGMT (Sarkaria *et al.*, 2008).

Também, outro mecanismo que pode ser responsável pela quimiorresistência em GBM em geral é a apresentação de um fenótipo inerente ou adquirido de resistência a multidrogas (*MDR – multidrug resistance*), relacionado à expressão da glicoproteína-P (P-gp), proteína que forma um transportador de membrana dependente de ATP capaz de bombear principalmente drogas de natureza hidrofóbica ou anfipática para fora das células, e por este motivo são conhecidas como bombas de efluxo. Em humanos, os genes *MDR1* (ou *ABCB1*) e *MDR3* estão relacionados à expressão da glicoproteína-P (P-gp), mas apenas os transcritos do *MDR1* é que conferem o fenótipo de resistência. Outras proteínas também classificadas como bombas de efluxo e relacionadas ao MDR são as MRP1, MRP3 (*multidrug resistance associated protein 1 e 3*) e BCRP (*breast cancer resistance protein*). Devido à homologia de sua natureza proteica, as bombas de efluxo foram incluídas na família ABC (*ATP binding cassette family*), sendo a P-gp também chamada de ABCB1 e a proteína BCRP denominada ABCG2 (Demule *et al.*, 2001; Breedveld *et al.*, 2006).

Tais proteínas estão relacionadas à proteção dos organismos contra entrada de xenobióticos, impedindo que estas atinjam níveis citotóxicos; por isso são encontradas normalmente na barreira hematoencefálica. A P-gp apresenta expressão exacerbada em tumores cerebrais primários de vários graus, incluindo GBM (Demule *et al.*, 2001). A resistência por bombas de efluxo sempre foi relacionada principalmente a drogas como Vincristina, Etoposide e Doxorubicina, porém Schaich e colaboradores (2009) demonstraram sua relação também com TMZ através de ensaios de citotoxicidade.

Tendo em vista a alta resistência ao tratamento convencional apresentada pelos GBM, e sabendo que diversas vias moleculares colaboram para este perfil, pode-se concluir que é de extrema importância a busca por novos alvos terapêuticos que tenham como característica intersectar várias vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento e manutenção do perfil neoplásico (Castro-Gamero *et al.*, 2013).

Nesse contexto, recente interesse tem sido depositado no fator de transcrição NF-kappaB. Em mamíferos, a família do NF-kappaB é composta por cinco membros, incluindo REL (c-Rel), RELA (p65), RELB, NF-kB1 (p50 e seu precursor p105) e NF-kB2 (p52 e seu precursor p100), e compartilham como característica homóloga o domínio Rel, que possui um sinal de localização do núcleo (NLS – *nuclear localization signal*) e está relacionado a formação de dímeros entre os membros da família, assim como em promover a ligação em sequências específicas do DNA e a proteínas da família IκB (Emdad, 2006; Inoue, 2007).

Em células normais, as proteínas da família do NF-kappaB se encontram no citoplasma como homo- ou heterodímeros ligados a proteínas inibitórias IκB, que as mantêm no estado inativo mascarando o NLS (Emdad, 2006; Bednarski, 2009). Sua ativação em células normais pode ser acionada por indutores como agentes carcinogênicos, radiação ultravioleta, radiação ionizante e alguns quimioterápicos (como Cisplatina, Doxorubicina e Vincristina), além de exposição a citocinas (TNF-alfa e IL1-beta) e fatores de crescimento (EGF e PDGF) (Zanotto-Filho, 2010; Spiller *et al.*, 2011).

Após a indução da ativação, o heterodímero mais abundante é formado pelas subunidades p50 e p65, relacionados à ativação transcricional (Emdad *et al.*, 2006). Para a ativação deste heterodímero, um complexo quinase κB (IKK), que consiste em duas subunidades catalíticas (IKKα e IKKβ) e uma subunidade regulatória (IKKγ/NEMO), fosforila a proteína inibitória IκB com marcadores para ubiquitinação e posterior degradação pelo proteossomo 26S, esta fosforilação culmina na liberação do NF-kappaB. O fator de transcrição pode então se translocar para o núcleo em sua forma ativa e modular a transcrição de diversos genes (Bednarski *et al.*, 2009).

Entretanto, as células cancerosas apresentam o NF-kappaB constitutivamente ativo. Já foi relatado em diversos estudos esta ativação constitutiva em cânceres como fibrossarcomas, leucemias, câncer de colo, ovário, tireoide, pâncreas, pulmão e mama, assim como em vários cânceres pediátricos de alta malignidade (Bednarski *et al.*, 2009; Spiller *et al.*, 2011; Emdad, 2006). Além disso, Nagai e colaboradores (2002), também mostraram que o NF-kappaB está ativado na grande maioria dos GBM.

Os principais alvos do NF-kappaB são genes envolvidos em vias anti-apoptóticas, reguladoras da proliferação celular e processos oncogênicos, como metástase e angiogênese (Emdad *et al.*, 2006; Bednarski *et al.*, 2009). Sendo assim, uma vez que o NF-kappaB está ativo nas células cancerosas, ele se torna um dos agentes capazes de garantir o desenvolvimento e a manutenção das características inerentes a estas neoplasias através da regulação destes alvos.

O NF-kappaB é capaz de regular mais de 150 genes (Naugler & Karin, 2008). Alguns estudos comprovaram a relação deste fator de transcrição com os genes responsáveis pela resistência dos GBM mencionados anteriormente. Alguns experimentos evidenciaram rápido acúmulo de NF-kappaB no núcleo concomitantemente a ativação de bombas de efluxo (Wang *et al.*, 1996; Labialle, *et al.*, 2002). Também Lavon e colaboradores (2007) demonstraram uma relação positiva entre a expressão do gene *MGMT* e a ativação do fator de transcrição NF-kappaB em linhagens celulares e em gliomas; descrevendo na região promotora do gene *MGMT* dois sítios de ligação para este fator de transcrição.

Assim, o perfil pleiotrópico apresentado por este fator de transcrição relaciona-o com diversos mecanismos responsáveis por desencadear o desenvolvimento e a resistência dos GBM, tornando-o uma molécula-alvo extremamente importante para pesquisas que visam melhorar o tratamento convencional para este tipo de tumor.

Com base nessas características, um dos focos de pesquisas atuais em busca de tratamentos alternativos para o GBM é a inibição do NF-kappaB (Gilmore & Herscovitch, 2006). Dentre algumas drogas capazes de inibir este fator de transcrição estão Pirrolidina Dithiocarbamato, Diethildithiocarbamato, Sulfasalazina, Curcumina e Bortezomibe (Spiller *et al.*, 2011). Entretanto, estas drogas não tem demonstrado alta especificidade. Recentemente, um novo inibidor do fator de transcrição de interesse denominado Deidroximetilepoxiquinomicina (DHMEQ) foi sintetizado e, ao contrário das outras drogas, possui alta especificidade para o NF-kappaB. O DHMEQ é o único inibidor capaz de bloquear a translocação do NF-kappaB para o núcleo sem que haja alterações na proteína inibitória Ikb, um mecanismo de ação de importantes implicações clínicas (Katsman *et al.*, 2009; Fukushima *et al.*, 2012). Trata-se de um composto de baixo peso molecular e com estrutura referente ao antibiótico Epoxiquinomicina, que possui toxicidade extremamente baixa quando comparada a outros antibióticos (Umezawa, 2006; 2011).

O DHMEQ atua se ligando a resíduos de cisteína presentes nas proteínas p65, c-REL, RELB e p50 da família REL, impedindo a translocação nuclear do fator. Além disso, tais resíduos são essenciais para que ocorra ligação do fator de transcrição ao DNA, e a ligação do DHMEQ nestes locais também impossibilita a interação com o DNA e consequentemente a ativação da

transcrição. Desta maneira o DHMEQ também se torna um inibidor altamente específico e com baixo efeito tóxico (Umezawa, 2011).

Alguns estudos iniciais dos efeitos do DHMEQ *in vivo* mostraram resultados positivos indicando que a nova droga poderia suprimir o crescimento de vários tipos tumorais (Fukushima, 2011). Resultados similares também foram obtidos em experimentos *in vitro* em de carcinoma de tireóide (Starenki *et al.*, 2004), câncer de bexiga (Horiguchi *et al.*, 2003), mieloma múltiplo (Watanabe *et al.*, 2005a), leucemia (Watanabe *et al.*, 2005b), câncer de mama (Matsumoto *et al.*, 2005), e câncer de próstata (Kikuchi *et al.*, 2003), entre outros.

Considerando os resultados de tais pesquisas, os avanços atuais na busca por novos alvos terapêuticos, assim como o melhor entendimento das características moleculares dos GBM, podemos afirmar que o tratamento deste tipo tumoral é um paradoxo inaceitável, que apesar de tantos progressos pouco evoluiu ao longo da última década e ainda confere ao paciente um péssimo prognóstico. Baseando-se neste contexto, o trabalho em questão propôs estudar a capacidade deste novo inibidor de NF-kappaB, o DHMEQ, de sensibilizar células de GBM aos tratamentos utilizados atualmente, focando também nos casos pediátricos, nos quais ainda não se estabeleceu um tratamento padrão mais adequado, sendo a terapia ainda considerada uma medida paliativa para este tumor tão maligno e letal cuja cura se mantém ilusória (Kerasi, 2011).

Objetivos

Tem-se como objetivo no trabalho em questão analisar os efeitos *in vitro* da inibição do fator NF-kappaB pelo DHMEQ, associado a quimioterápicos convencionais, como TMZ e VP-16 e à radiação ionizante, em linhagens celulares de GBM adulto e pediátrico em relação à resistência e sensibilização aos tratamentos convencionais.

2.1. Objetivos específicos:

1. Analisar a dinâmica da expressão de genes associados à quimiorresistência (*MGMT*, *MDR1*, *MRP1* e *BCRP1*) em linhagens de GBM tratadas com diferentes concentrações de DHMEQ;
2. Avaliar o efeito radio- e quimiossensibilizante do DHMEQ em linhagens de GBM tratadas *in vitro* com terapias tradicionais (drogas e radiação ionizante)

Materiais e

Métodos

3.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultura

Para realização deste trabalho foram utilizadas linhagens de GBM adulto U138-MG e T98G consideradas resistentes a TMZ por expressarem *MGMT* (adquiridas no American Type Culture Collection, USA), e duas linhagens de GBM pediátrico, sendo elas SF188 (gentilmente cedida pela Dra. Nada Jabado – Mc Gill University, Montreal, Canadá) e KNS-42 (importada do Japão através do banco de linhagens da Universidade Federal do Rio de Janeiro). Todas as linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de 75cm², incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Como meio de cultivo foi utilizado meio HAM F10, complementado com 60mg/L de penicilina, 100mg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) a pH de 7,2-7,4; com exceção da linhagem KNS-42, para a qual foi utilizado meio MEM complementado com 60mg/L de penicilina, 100mg/mL de estreptomicina e 5% de soro bovino fetal (SBF, Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) a pH de 7,2-7,4.

As células em cultura, quando confluentes, foram desprendidas através do uso de 0,05 % da enzima tripsina (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), e expandidas para novas garrafas ou congeladas com SBF e 10%DMSO a -80°C. Os experimentos foram realizados com células com menos de 10 passagens a partir de seu descongelamento.

3.2 Drogas

A solução estoque de DHMEQ (gentilmente cedido pelo Professor de Bioquímica Dr. Kazuo Umezawa, Universidade de Keio do Japão) foi preparada com DMSO em uma concentração de 10 mg/ml e filtrada em filtro millipore (0,2µm) sendo armazenada a -20°C. As células foram tratadas com as concentrações finais de 2,5, 5, 10 e 20 µg/ml de DHMEQ (Figura 1).

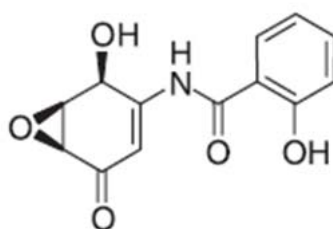


Figura 1: Estrutura molecular do DHMEQ (Umewaza, 2006).

A Temozolomida (TMZ) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi diluída em DMSO em concentração estoque de 200 mM, também filtrada em filtro Millipore® (0,2µm), e estocada a -20°C, mantendo sua atividade por pelo menos seis meses (Figura 2).

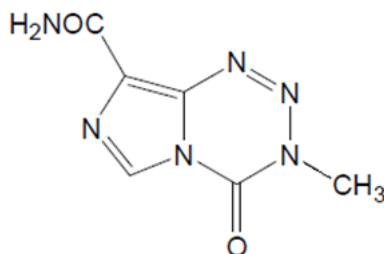


Figura 2: Estrutura molecular da TMZ (Zhang *et al.*, 2012).

O Etoposide (VP16) foi adquirida da Sigma-Aldrich do Brasil, e diluída em água destilada como indicado pelo fabricante (Figura 3).

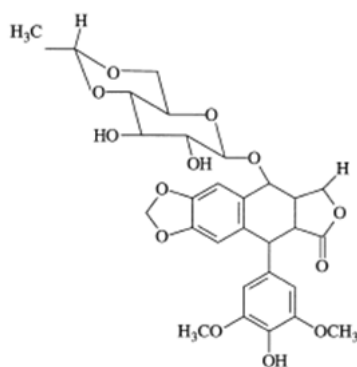


Figura 3: Estrutura molecular do VP16 (Burden & Osherooff, 1998).

Todas as drogas utilizadas eram diluídas em meio de cultura imediatamente antes do tratamento das células.

3.3 Extração de mRNA e análise de expressão gênica por RT- qPCR

Através da PCR quantitativa em tempo real (RT- qPCR) foram mensuradas alterações na expressão dos genes *MDR1*, *MRP1* e *BCRP* em todas as linhagens utilizadas neste trabalho, e *MGMT* nas linhagens T98G e U138-MG.

Aproximadamente 1×10^6 células de cada linhagem foram tratadas com DHMEQ nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10 $\mu\text{g/mL}$ e foram obtidas amostras calibradoras de cada linhagem pelo tratamento com DMSO. Realizou-se a extração de RNAm dessas células a partir do reagente Trizol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) conforme instruções do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas e a partir destas foram sintetizadas amostras de cDNA por meio do kit High Capacity® (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

Com auxílio de sondas TaqMan® (*MDR1* - 00184491; *MRP1* - Hs00219905m1; *BCRP* - Hs01053787m1; *MGMT* - Hs01037698m1) foram mensurados os níveis de cDNA para cada tratamento e calibrador através do aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os endógenos utilizados foram *TBP* (*TATA-box binding protein*) (4326322E0811008), e *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*) (4310809E0502006) (Applied Biosystems). As amostras foram quantificadas em triplicata e com volume final de 10 μL , sendo utilizados 5,0 μL do Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, part number 4304437), 0,5 μL de sonda e 4,5 μL de cDNA. O desvio padrão considerado foi de $p < 0,003$ e para todas as amostras a quantificação relativa da expressão gênica foi determinada através do método $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

3.4 Ensaio do Cometa

O “ensaio de eletroforese em gel para células isoladas” (*single cell gel electrophoresis assay*) teve como base o protocolo estabelecido por Singh et al (1988). Para a realização deste experimento, foram utilizadas as linhagens T98G e U138-MG pré-tratadas com DHMEQ nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ e após 6h, TMZ na concentração de 250 μM , sendo então reincubadas por mais 6h. As células foram tripsinizadas e a suspensão foi centrifugada a 500rpm, na temperatura de 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em agarose de baixo ponto de fusão (37°C) 0,5%, essa mistura foi espalhada em lâminas recém-preparadas com uma camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5% e cobertas com lamínula. Após a solidificação da agarose, a lamínula foi retirada cuidadosamente e as lâminas foram submersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) por 24h a 4°C. Após este período as lâminas foram levadas a uma cuba de eletroforese e mergulhadas em solução tampão de eletroforese (NaOH 0,3 M e Na₂EDTA 1 mM, pH > 13) por 20 minutos, e então foi aplicada

uma corrente de 25V, 300mA por 20 minutos na temperatura de 4°C. Após este procedimento, as lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos, e depois de secas em temperatura ambiente, foram fixadas em etanol 100%.

A coloração do material para análise foi realizada através da adição de 20 µl/mL de SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (ZEISS, filtro 515-560 nm e barreira de filtro de 590 nm) utilizando a objetiva 400, sendo fotografados 50 nucléolos por lâmina através do programa AxioVision 3.1 (Zeiss, Gottingen, Germany). Os nucléolos que apresentavam dano no DNA apareceram em forma de cometa, sendo a intensidade e o comprimento da cauda proporcional à quantidade de dano; estas variáveis foram mensuradas através do programa *Olive tailmoment* com TriTek Comet Score FreeWare v1.5 (TriTek, Sumerduck, VA, USA).

3.5 Ensaio de Proliferação Celular

O objetivo da realização deste ensaio é verificar a capacidade que os quimioterápicos apresentam de inibir a proliferação das células sob diferentes tipos de tratamentos. Para tal, as linhagens T98G, U138-MG, SF188 e KNS-42 foram semeadas em uma concentração de 2×10^3 células por poço em placas de 96 poços e foram cultivadas por 24h. Após este período de incubação em estufa, realizaram-se os tratamentos seriados com DHMEQ (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 µg/mL), TMZ (250, 500, 1000, 2000 µM) e VP16 (50, 100, 200, 400 µM) no tempo de 48h, com as drogas isoladas. Em todos os casos, os ensaios foram analisados pelo método colorimétrico com Giemsa.

3.5.1. Coloração com Giemsa

Após o período de tratamento com os quimioterápicos, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS (1x) e fixadas com Metanol absoluto. As células foram então coradas com 100 µL de Giemsa (1%) por poço durante 15min, e então lavadas em água corrente. Após a secagem, o corante foi diluído em 100 µL de metanol absoluto por poço. A absorbância foi mensurada pelo aparelho iMark microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) em um comprimento de onda de 655nm.

3.5.2. Combinação entre os quimioterápicos

A partir dos resultados obtidos com os tratamentos das drogas isoladas, foram calculados, através do software Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA), os valores de IC_{30} , definido como a concentração necessária do quimioterápico para que haja uma redução de 30 % na proliferação. Este valor foi calculado para cada linhagem celular e então foi determinada a média para cada quimioterápico.

As concentrações correspondentes aos IC_{30} da TMZ e do VP-16 foram combinadas de dois modos às concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 $\mu\text{g/mL}$ de DHMEQ. O primeiro tratamento realizado foi de modo concomitante, isto é, após 24h de incubação das placas, o meio de cultura foi removido e um novo meio contendo as diferentes doses de DHMEQ aplicado juntamente à concentração correspondente ao IC_{30} médio da TMZ, ou junto à concentração correspondente ao IC_{30} médio do VP-16, foi utilizado para o tratamento. O segundo tipo foi o sequencial, no qual o meio de cultura foi descartado e um novo meio tratado com as diferentes concentrações de DHMEQ foi aplicado; após 6h a este tratamento, aplicou-se a concentração correspondente ao IC_{30} da TMZ ou do VP-16, caracterizando um pré-tratamento. As células ficaram sob tratamento durante 48h a partir da última droga aplicada.

Em todos os casos, os efeitos das interações entre o DHMEQ e os quimioterápicos tradicionais foram analisados através do software CalcuSyn v2.0 (Biosoft, Ferguson, MO), que fornece o Índice de Combinação (*Combination Index - CI*), um valor que determina o tipo interação das drogas combinadas, classificando-as em sinérgicas ($CI < 1$), aditivas ($CI = 1$) ou antagônicas ($CI > 1$). Este valor CI é baseado na equação de Chou e Talalay (1984). O Software Calcsyn também foi usado para calcular o Índice de Redução de Dose (*Dose Reduction Index - DRI*) das drogas combinadas, que estima o quanto a dose de um ou mais agentes na combinação pode ser reduzida para atingir níveis comparáveis aos das drogas individualmente.

3.6 Ensaio Clonogênico após irradiação

Este ensaio visa avaliar a capacidade de formação de colônias das linhagens celulares após tratamento sequencial de DHMEQ e diferentes doses de irradiação. Para isso, 300 células por poço foram semeadas em placas de seis poços e após o período de aderência foram tratadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de DHMEQ. Após 24h, as células foram lavadas e submetidas a

irradiação nas doses de 2, 4 e 6 Gy com raios γ de uma fonte de ^{60}Co balto, a uma taxa de dose de $\sim 0,4$ Gy/min., usando-se o equipamento Gammatron S-80 (Siemens Medical Systems Inc., South Iselin, USA), do Setor de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP).

O tempo de exposição foi calculado conforme a dose pretendida e se considerou o decaimento do radioisótopo, a irradiação foi aplicada na parte inferior das placas. Após este tratamento as células voltaram para estufa e foram incubadas por sete dias, tempo suficiente para a formação de colônias em todas as linhagens.

Para visualização das colônias o meio de cultura foi descartado e as células foram fixadas com metanol absoluto e coradas com Giemsa (1%). A contagem foi realizada com auxílio de estereomicroscópio (40x) e foram consideradas apenas colônias com número de células maior ou igual a 50. Cada linhagem foi plaqueada em triplicada e cada experimento foi repetido duas vezes.

Para analisar a contagem foram usadas três fórmulas:

- 1)
$$EP = \frac{\text{n}^\circ \text{ colônias formadas}}{\text{n}^\circ \text{ de células plaqueadas}} \times 100$$
- 2)
$$FS = \frac{\text{n}^\circ \text{ colônias formadas após tratamentos}}{\text{n}^\circ \text{ de células plaqueadas} \times EP}$$
- 3)
$$DER = \frac{FS \text{ para uma dose de irradiação}}{FS \text{ para uma dose de irradiação} + \text{droga}}$$

A primeira fórmula corresponde a Eficiência de Plaqueamento e diz respeito ao controle, isto é, é a capacidade que uma célula de determinada linhagem tem de formar colônias sem nenhum tipo de tratamento. A segunda fórmula é a Fração de Sobrevivência, que representa a porcentagem de células capazes de formar colônias após o tratamento, levando em consideração o EP de cada linhagem.

Já a terceira fórmula calcula a Taxa de Reforço de Dose (*Dose Enhancement Ratio - DER*), que irá estabelecer se a associação entre a droga e a irradiação tem efeito aditivo (aumenta a eficiência da irradiação quando esta é combinada com a droga - $DER=1$), sinérgico (representa a somatória dos efeitos da irradiação e da droga quando tratadas isoladamente - $DER > 1$) ou sub-aditivo (quando a droga não auxilia a irradiação - $DER < 1$).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SigmaStat (Jandel Scientific Co., San Rafael, CA, USA). Para análise da dinâmica de expressão gênica após tratamento foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Para avaliar estatisticamente os ensaios funcionais foi usada a análise de variância ANOVA (one e two-way) seguida pelo teste pareado Holm-Sidak *Pairwise Multiple Comparison*, considerando-se o nível de significância de $\alpha = 0,05$ para todos os testes realizados.

Resultados

4.1 Expressão Gênica de *MDR1*, *MRP1*, *BCRP* e *MGMT* em linhagens celulares de Glioblastoma.

Através da técnica RT-qPCR determinamos a expressão de três genes relacionados à formação de bombas de efluxo da família ABC (*BCRP*, *MDR1* e *MRP1*) em todas as linhagens utilizadas neste trabalho. Além destes, foi verificada a expressão do gene *MGMT*, que é responsável pela transcrição de uma enzima de reparo do DNA, nas linhagens de GBM adulto T98G e U138-MG, consideradas resistentes ao tratamento convencional pela expressão exacerbada deste gene. Em todos os casos os níveis de expressão de tais genes foram mensurados depois do tratamento com DHMEQ nas doses de 2,5; 5,0; 10 µg/mL.

Analisando a média da expressão dos genes relacionados a bombas de efluxo obtida a partir das quatro linhagens testadas, podemos observar que, de modo geral, nas concentrações mais altas do tratamento com DHMEQ ocorre aumento da expressão dos genes *BCRP*, *MDR1* e *MRP1* em relação ao controle.

Entretanto podemos observar grande variabilidade da expressão dos genes conforme as linhagens estudadas. A linhagem T98G apresentou aumento de expressão sob altas doses de DHMEQ dos genes *MDR1* e *MRP1*, enquanto que a segunda linhagem adulta, U138-MG, demonstrou aumento de expressão em relação ao controle nos genes *BCRP* e principalmente *MDR1*.

A expressão dos genes *MDR1* e *MRP1* na linhagem de GBM pediátrica SF188 praticamente se mantém estável em todos os tratamentos, exibindo um aumento progressivo da expressão apenas no gene *BCRP* conforme aumento da concentração usada no tratamento. Na segunda linhagem pediátrica, KNS-42, também podemos perceber uma dinâmica de expressão semelhante entre genes *MRP1* e *BCRP*, já o *MDR1* apresenta maior taxa de expressão relativa no tratamento de 2,5µg/mL, e a partir de então reduz sua expressão de modo dose-dependente (Figura 4).

Os resultados obtidos pela RT-qPCR do gene *MGMT* nas duas linhagens adultas apresentaram diminuição gradual na expressão relativa sob os tratamentos de 2,5 e 5 µg/mL. Na concentração de 10 µg/mL, entretanto, pode ser observado uma expressão relativa maior deste gene que nas concentrações mais baixas (Figura 4), mas ainda continua reduzido em relação ao controle.

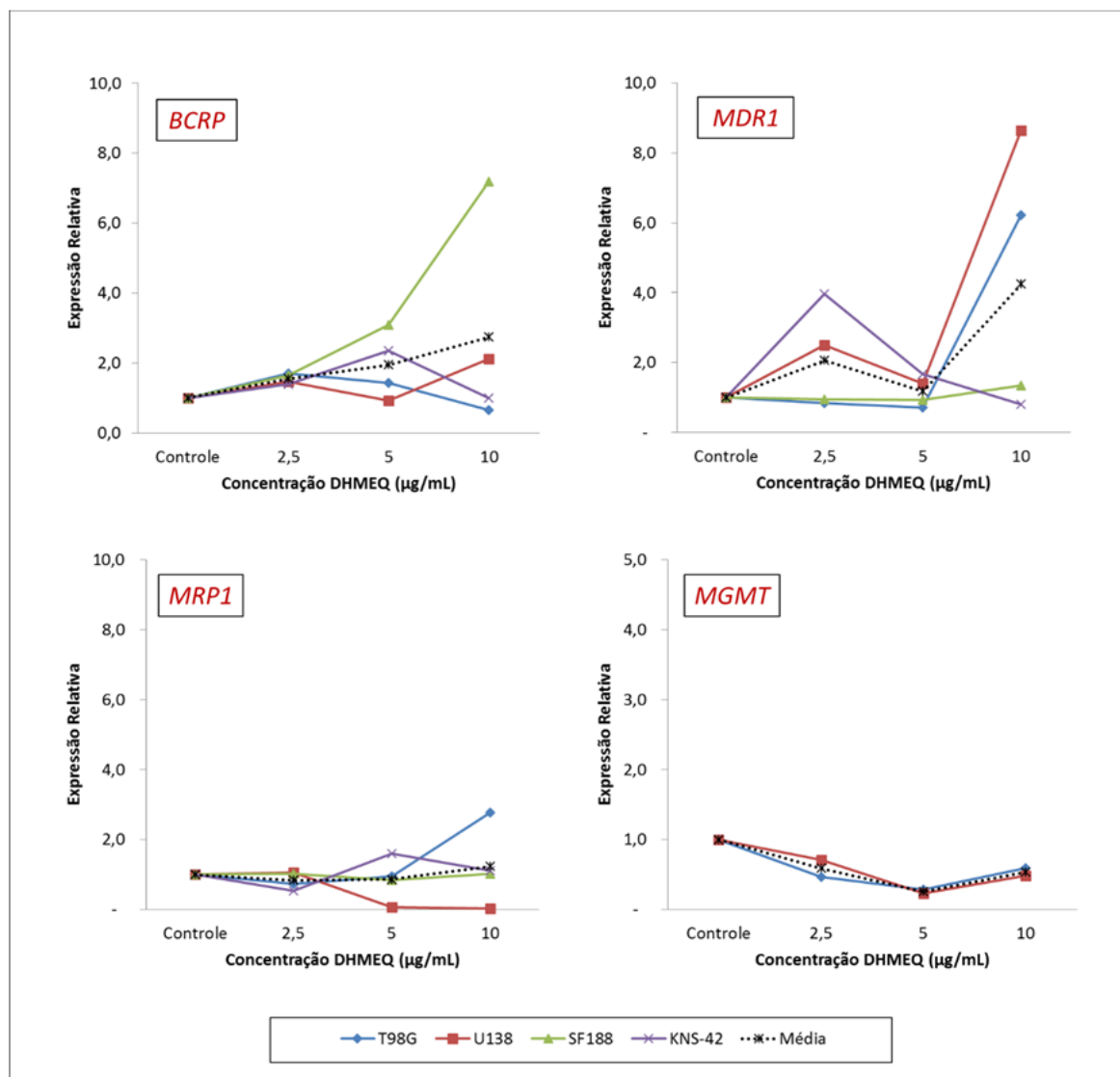


Figura 4: Dinâmica de expressão de genes relacionados à resistência a drogas em linhagens de GBM após tratamento com DHMEQ. Os dados foram obtidos pela técnica RT-qPCR e analisados através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

4.2 DHMEQ potencializa a ação clastogênica da TMZ.

Visando verificar os efeitos do DHMEQ quando combinado com a TMZ, foi realizado o Ensaio do Cometa nas linhagens U138-MG e T98G, as mais resistentes ao tratamento tradicional. Com esse objetivo, as células foram pré-tratadas com DHMEQ nas concentrações de 10 e 20 µg/mL, e então tratadas com o quimioterápico TMZ na concentração sub-tóxica de 250mM.

Baseando-se no princípio de que a TMZ gera quebras no DNA, o ensaio cometa consiste em passar uma corrente elétrica pelas células tratadas, conforme isso acontece, os menores fragmentos clivados de DNA migram para fora do núcleo, enquanto fragmentos maiores ficam retidos dentro deste. Deste modo, os menores fragmentos formam uma cauda com intensidade e extensão mensuráveis, e conforme esta medida, podemos calcular indiretamente a quantidade de dano gerado pela droga no DNA, representado como momento da cauda na Figura 5.

Na Figura 5, fica evidente uma potencialização dos danos ao DNA causados pela TMZ quando esta é associada ao DHMEQ em ambas as linhagens, indicando sinergia entre as drogas. Na linhagem T98G, observamos potencialização de tais danos em mais de duas vezes quando as células foram pré-tratadas com a concentração de 20µg/mL. A linhagem U138-MG apresentou aumento significativo no dano ao DNA quando a TMZ era combinada com DHMEQ tanto na concentração de 20 µg/mL, como também na menor concentração.

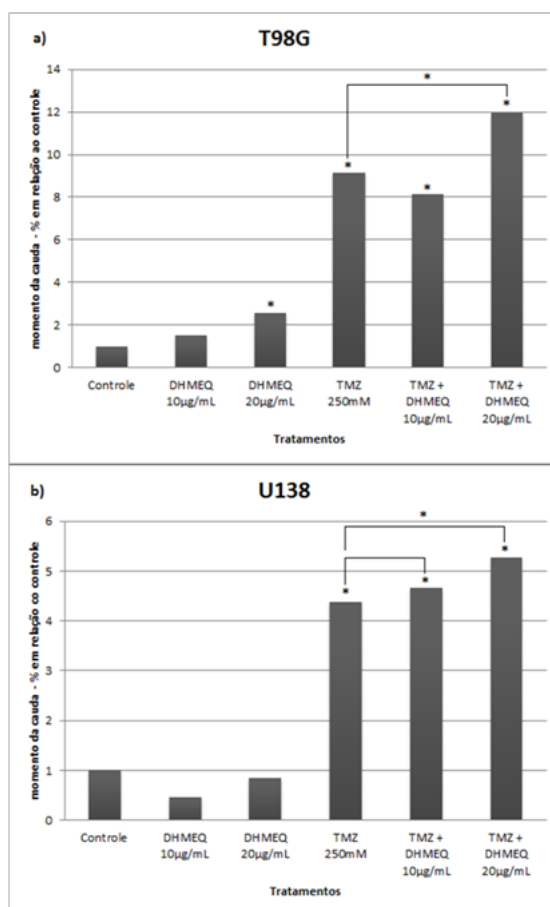


Figura 5: Valores do Momento da Cauda para tratamentos sequenciais de DHMEQ e TMZ nas linhagens de GBM adulto. Através deste valor fornecido pelo ensaio cometa, podemos verificar que ocorre uma potencialização da ação clastogênica da TMZ quando se realiza o pré-tratamento com o DHMEQ ($P < 0,05$).

4.2. DHMEQ sensibiliza linhagens de Glioblastoma a diferentes quimioterápicos

A fim de avaliar o efeito do DHMEQ quando combinado a diferentes quimioterápicos, utilizou-se o ensaio de proliferação celular no tempo de 48h. As combinações com as drogas TMZ e VP-16 foram testadas em quatro linhagens de GBM, duas delas adultas e resistentes ao tratamento convencional (T98G e U138-MG) e duas pediátricas (SF188 e KNS-42). Foram utilizadas as concentrações de 250, 500, 1000 e 2000 μM para o tratamento com a TMZ pura e as concentrações de 50, 100, 200 e 400 μM para o tratamento com VP-16 isolado. A partir de então se estabeleceu a concentração equivalente ao IC_{30} (médio) de 1500 μM para a TMZ e de 40 μM para o VP-16. Realizou-se então a combinação com DHMEQ nas doses 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 $\mu\text{g/mL}$ de modo concomitante e sequencial.

Nos experimentos nos quais foi utilizada a TMZ isolada percebemos que todas as linhagens demonstram diminuição da proliferação conforme aumento na dosagem chegando a um valor médio de cerca de 33% (variando de 20% na linhagem SF188 a 40% na U138-MG) de redução no tratamento de 2000 μM . Nos ensaios de combinação concomitante, houve um aumento na sobrevivência das células nas maiores doses de DHMEQ prejudicando o efeito da droga isolada. Entretanto, no tratamento sequencial há uma potencialização do efeito da TMZ isolada graças ao DHMEQ, tornando-a mais efetiva principalmente nas menores concentrações, e chegando a uma redução na proliferação de até 54% (variando de 44% na linhagem U138-MG a 61% na KNS-42) no tratamento de 20 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6).

A Tabela I mostra, através do cálculo pelo software Calcsyn[®] do Índice de Combinação (CI), o efeito antagônico na maioria das linhagens quando a TMZ era combinada de modo concomitante ao DHMEQ ($\text{CI} > 1$), e o efeito sinérgico da combinação destas drogas quando o tratamento era realizado de modo sequencial ($\text{CI} < 1$). Além disso, a tabela apresenta os valores do Índice de Redução de Dose que, principalmente na linhagem SF188, apresentou valores extremamente altos.

Nos tratamentos com o quimioterápico VP-16 observa-se respostas diferentes a esta droga manipulada de modo isolado dependendo da linhagem e da concentração usada, sendo que apenas a KNS-42 foi sensível de modo dose-dependente. Ao analisar os resultados da combinação com o DHMEQ de modo concomitante, percebe-se que houve uma sensibilização das linhagens mais resistentes, no caso as duas linhagens de GBM adulto, principalmente nas menores doses, entretanto, para as linhagens mais sensíveis observa-se um efeito antagônico das drogas, aumentando sua sobrevivência quando comparadas à droga pura. Porém, em média, a redução da proliferação no tratamento concomitante foi de

somente cerca de 10%. Apenas através do terceiro experimento, isto é, da combinação de modo sequencial, é que se podem observar os melhores resultados: todas as linhagens foram sensibilizadas ao VP-16, chegando a uma redução na proliferação de aproximadamente 43% na maior concentração de DHMEQ (Figura 7).

Na Tabela II constam os valores do Índice de Combinação e do Índice de Redução de Dose entre cada concentração de DHMEQ e 40 μ M de VP-16 para cada linhagem, calculados pelo programa Calcsyn[®]. Podemos observar efeito sinérgico em todas as linhagens quando era realizado o pré-tratamento, além de valores extremamente altos do DRI principalmente nas linhagens SF188 e T98G.

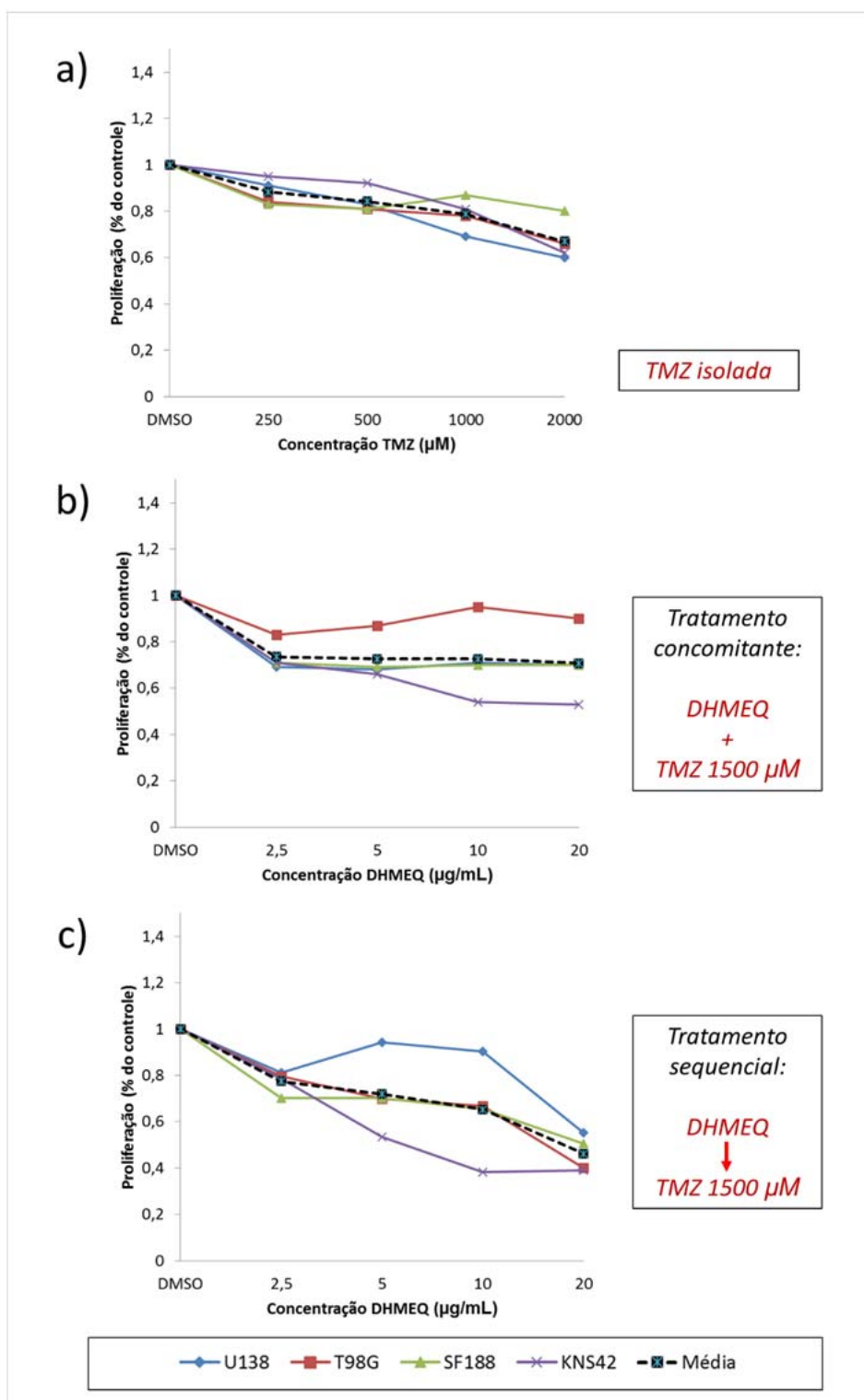


Figura 6: Fração de Sobrevivência de quatro linhagens celulares de GBM no ensaio de proliferação sob tratamento com TMZ pura (isolada) (a), e tratamentos combinados de modo concomitante (b) e sequencial (c) ao DHMEQ. Os melhores resultados obtidos foram através do tratamento sequencial. Todos os desvios-padrão foram menores que 0,05.

Tabela I: Valores do Índice de Combinação (CI) e Índice de Redução de Dose (DRI) para a combinação de modo concomitante e sequencial de TMZ e DHMEQ. Observou-se sinergismo (em cinza) em todas as linhagens quando tratamento era realizado de modo sequencial.

DHMEQ (µg/mL)+TMZ (uM)					
DHMEQ	TMZ	concomitante		sequencial	
U138		CI	DRI	CI	DRI
2,5	1500	1,28	0,78	2,57	0,39
5,0	1500	1,22	0,82	10,75	0,09
10,0	1500	1,41	0,71	5,82	0,17
20,0	1500	1,34	0,74	0,68	1,47
T98G		CI	DRI	CI	DRI
2,5	1500	4,65	0,23	2,91	0,38
5,0	1500	9,46	0,12	1,21	1,17
10,0	1500	88,43	0,01	1,25	1,60
20,0	1500	10,70	0,06	0,57	17,98
SF188		CI	DRI	CI	DRI
2,5	1500	0,51	5,05 e+013	0,49	3,19 e+014
5,0	1500	0,92	4,5 e+015	0,98	2,98 e+014
10,0	1500	1,93	4,87 e+014	1,51	2,29 e+019
20,0	1500	3,87	4,87 e+014	1,61	1,64 e+031
KNS42		CI	DRI	CI	DRI
2,5	1500	1,49	1,03	2,15	0,73
5,0	1500	1,60	1,24	0,96	2,25
10,0	1500	1,45	1,89	0,77	2,20
20,0	1500	2,26	1,95	1,27	1059,00

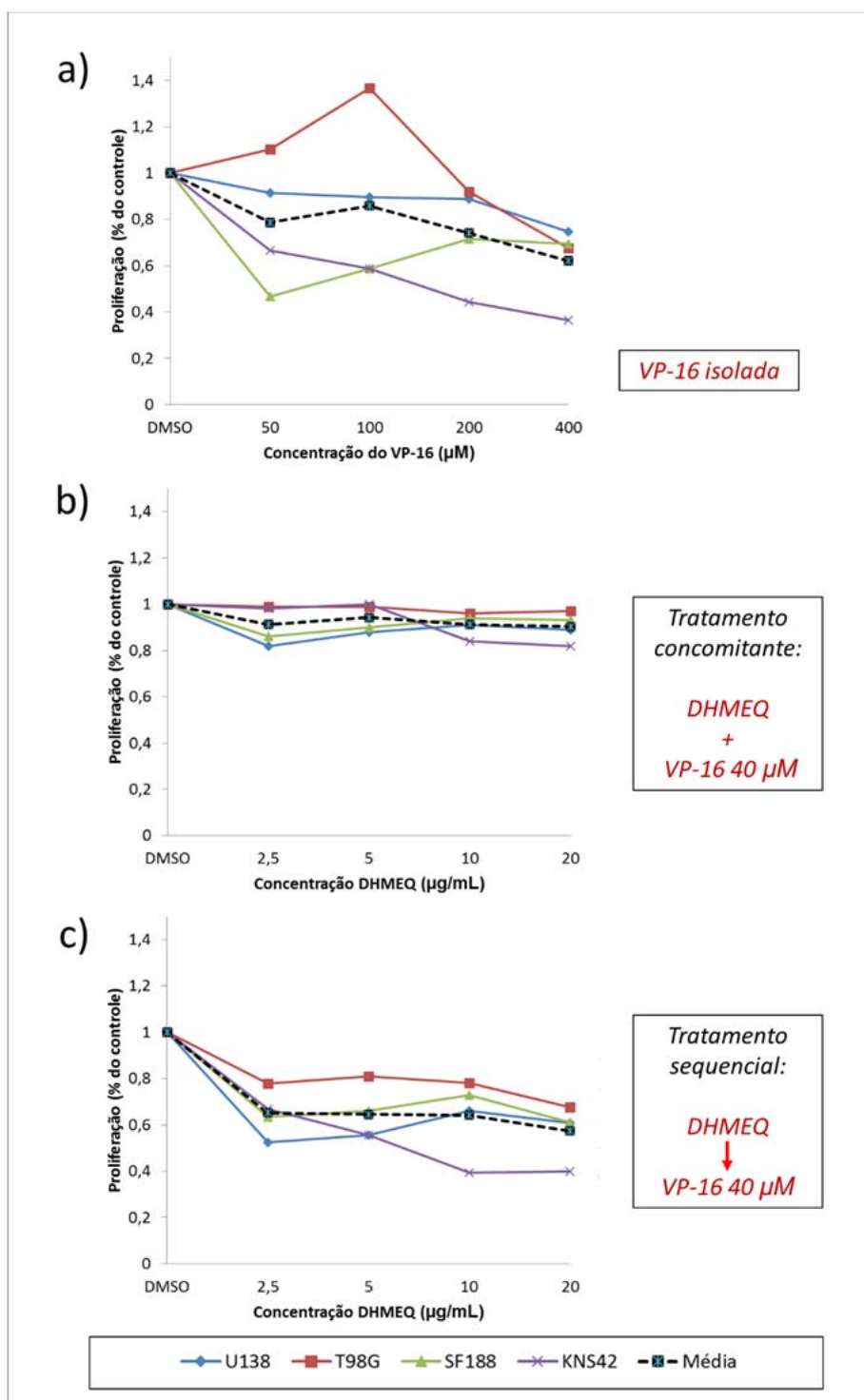


Figura 7: Fração de Sobrevivência de quatro linhagens celulares no ensaio de proliferação sob tratamento com VP-16 pura (isolada) (a), e tratamentos combinados de modo concomitante (b) e sequencial (c) ao DHMEQ. Os melhores resultados obtidos foram através do tratamento sequencial. Os desvios-padrão foram menores que 0,05 em todos os casos.

Tabela II: valores do Índice de Combinação (CI) e Índice de Redução de Dose (DRI) entre DHMEQ e VP-16, sendo encontrado sinergismo apenas no tratamento sequencial (indicados em cinza).

DHMEQ (µg/mL)+VP-16 (uM)					
DHMEQ	VP-16	concomitante		sequencial	
U138		CI	DRI	CI	DRI
2,5	40	12,48	0,08	0,26	3,92
5,0	40	46,10	0,02	0,36	2,76
10,0	40	111,35	0,01	1,23	0,82
20,0	40	60,39	0,02	0,65	1,54
T98G		CI	DRI	CI	DRI
2,5	40	3,66	1,95 e+152	0,24	3,65 e+030
5,0	40	7,32	1,95 e+152	0,57	5,75 e+037
10,0	40	4,65	5,05 e+100	0,99	2,28 e+031
20,0	40	11,83	3,58 e+111	1,31	2,82 e+012
SF188		CI	DRI	CI	DRI
2,5	40	1,39	1,35 e+012	2,05	0,59
5,0	40	4,21	7,27 e+015	0,92	7,69
10,0	40	15,41	1,9 e+021	2,27	1,29 e+004
20,0	40	25,75	4,65 e+019	19,85	0,06
KNS42		CI	DRI	CI	DRI
2,5	40	157,58	0,01	1,24	1,21
5,0	40	1,98 e+004	5,25 e-005	0,87	2,62
10,0	40	8,55	0,26	0,61	7,56
20,0	40	11,10	0,33	1,11	7,42

4.1 DHMEQ sensibiliza linhagens de glioblastoma a radiação ionizante.

Através do ensaio clonogênico, no qual as linhagens celulares foram irradiadas com doses de 2, 4 e 6Gy ou/e pré-tratadas com DHMEQ sob concentração de 10µg/mL e irradiadas com as mesmas doses, pudemos observar, em todas as linhagens estudadas, uma redução na fração de sobrevivência (FS) nas células pré-tratadas, comparando-se com o controle apenas irradiado, demonstrando que o DHMEQ gera radiosensibilidade (Figura 8).

Os cálculos da Taxa de Redução de Dose (*Dose Enhancement Ratio* - DER) demonstraram um efeito supra-aditivo (DER > 1) entre todas as linhagens pré-tratadas e irradiadas com as três doses (2, 4 e 6Gy), chegando a taxas de redução relativamente altas,

como pode ser observado na linhagem U138-MG irradiada a 2Gy, cujo DER indicou que podemos reduzir a dose de radiação em aproximadamente 16 vezes. No caso das linhagens SF-188 e KNS-42 foi possível observar ausência de crescimento de colônias, representado pelo símbolo ∞ , evidenciando a alta capacidade radiosensibilizante da droga (Tabela III).

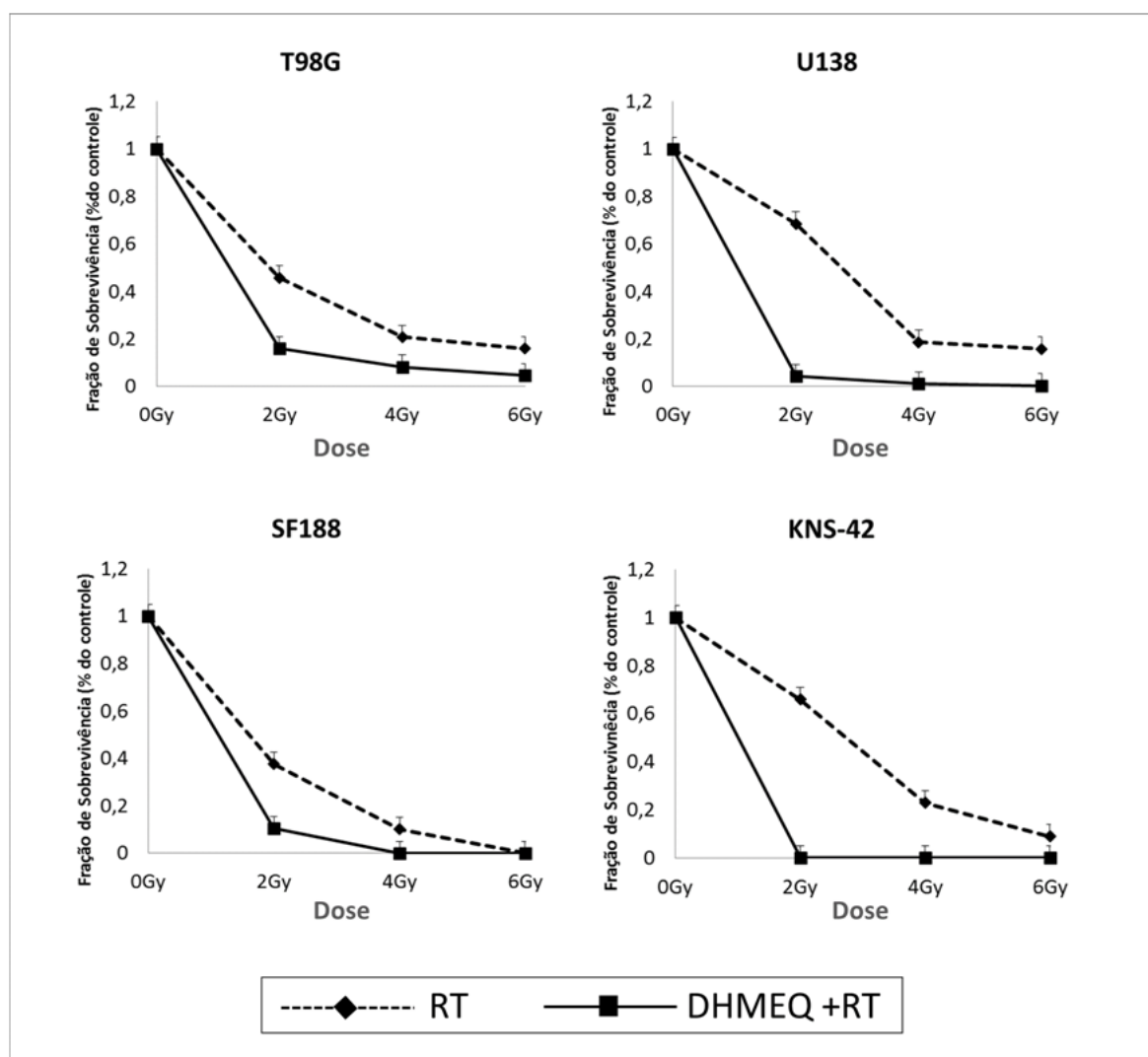


Figura 8: Ensaio de sobrevivência clonogênica de linhagens GBM irradiadas com 2, 4 e 6Gy e células pré-tratadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de DHMEQ antes da irradiação com as mesmas doses. O tratamento radiosensibilizou todas as linhagens. (RT = Radioterapia)

Tabela III: Valores da Taxa de Redução de Dose (DER) obtidos a partir do pré-tratamento com DHMEQ e irradiação com três diferentes doses. A habilidade do DHMEQ de sensibilizar células a radiação ionizante foi verificada através do ensaio de formação de colônias seguido por cálculo da Taxa de Redução de Dose. Valores de DER>1 indicam efeito sinérgico entre DHMEQ e irradiação. O símbolo ∞ representa ausência completa de colônias, situação que pode ser verificada nas duas linhagens pediátricas.

Tratamento		Linhagem Celular			
	Dose da Irradiação	U138MG	T98G	SF188	KNS-42
DHMEQ 10 μ g/mL	2Gy	15,96	2,87	3,61	∞
	4Gy	1,5	2,52	∞	∞
	6GY	1,42	3,59	∞	∞

Discussão

Apesar dos avanços na identificação e caracterização de aspectos moleculares dos GBM, do melhoramento em tecnologias para o procedimento cirúrgico, assim como para a radioterapia, além do desenvolvimento de pesquisas que focam na busca por novos alvos terapêuticos moleculares, o panorama clínico dos pacientes com gliomas malignos continua desolante (Groot & Milano, 2009).

O tratamento tradicional aplicado aos GBM consiste em ressecção cirúrgica seguida por radio- e quimioterapia, utilizando a TMZ no tratamento adjuvante (Iacob & Dinca, 2009). Tais terapias usam como estratégia provocar danos ao DNA, seja pela radiação ionizante, seja pela inserção de grupamentos -metil na dupla fita, visando induzir morte celular e regressão do tumor. Entretanto, quando certas proteínas de reparo estão expressas, como é o caso das células que expressam a enzima MGMT, esses tratamentos tem sua eficácia diminuída, o que leva a inferir que ao inibir tais proteínas, provoca-se um efeito radio- e quimiossensibilizantes nas células (Perry *et al.*, 2012). Sendo assim, podemos inferir que a ineficácia do tratamento padrão utilizado se deve, ao menos em parte, ao perfil de resistência exibido por este tipo tumoral.

Alguns outros mecanismos de resistência apresentados pelas células tumorais são mutações, amplificação da expressão de determinados genes, regulação de produtos gênicos que inativam a droga ou super-expressão de bombas de resistência a multidrogas que expõem os quimioterápicos da célula (Katsman *et al.*, 2006).

Conforme os mecanismos moleculares de resistência dos tumores foram sendo elucidados, novas estratégias que visam tanto sobrepujar quanto prevenir o desenvolvimento de tais mecanismos foram sendo desenvolvidas. Entretanto, embora numerosos mecanismos de resistência já tenham sido apontados e descritos, nenhum deles levou a descoberta de agentes que possam efetivamente influenciar nestes mecanismos. Uma das razões para essa situação é a especificidade das drogas desenvolvidas, que na grande maioria são capazes de inibir apenas vias alvo-específicas (Lackner *et al.*, 2012).

Atualmente, consideram-se como melhores opções para a terapia alvo-específica as moléculas que são diferencialmente expressas no câncer, e que também tenham a característica de ser o interseco de várias vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento e manutenção do perfil neoplásico (Castro-Gamero *et al.*, 2013), como é o caso do NF-kappaB, caracteristicamente hiper-ativo em células tumorais e com perfil pleiotrópico.

Sendo assim, um dos objetivos deste trabalho foi analisar o efeito gerado pela inibição do fator de transcrição NF-kappaB através DHMEQ na expressão de genes relacionados a mecanismos de resistência.

Visando analisar essa influência, foram realizadas RT-qPCRs dos genes *MDR1*, *MRP1*, *BCRP* e *MGMT*, sendo os três primeiros associados a expressão de bombas de efluxo que expõem xenobióticos (substâncias químicas estranhas ao organismo) para fora das células, como é o caso dos quimioterápicos, e o *MGMT* relacionado ao mecanismo de reparo do DNA com danos gerados a partir de agentes alquilantes.

Devido ao fato de que tais genes são regulados em parte pelo NF-kappaB, após a inativação deste fator de transcrição pelo DHMEQ era esperado que todos apresentassem sua expressão reduzida de modo dose-dependente ao aumento na concentração do DHMEQ. Entretanto, os genes relacionados à expressão de bombas de efluxo demonstraram, em média, um aumento em sua expressão diretamente proporcional ao aumento na concentração da droga. Dados encontrados na literatura confirmam que a ativação dos genes *MDR1*, *MRP1* e *BCRP* não é apenas regulada pelo NF-kappaB, mas também por outros fatores.

Segundo Natarajan (2012), o promotor predominante do gene *BCRP* foi caracterizado por Bailey-Dell *et al.* e possui sua região promotora regulada por diversos fatores de transcrição, dentre eles podemos incluir GLI, NFR2, AhR, ER α , HIF1 α , XBP1, PRB, SP1, além do NF-kappaB. Do mesmo modo, o gene *MRP1* também possui vários fatores de transcrição que podem associar-se à sua região promotora, por exemplo, Sp1, c-jun e junD e *MYCN* (Cho *et al.*, 2011). Na literatura consta que também o gene *MDR1* apresenta diversos fatores de transcrição relacionados ao controle de sua expressão, como AP-1, o próprio NFkB/p65/c-fos, além de prováveis novos fatores ainda não descritos (Labialle *et al.*, 2002).

Com bases nestes dados, pode-se inferir que apesar do DHMEQ ter inibido o NF-kappaB, os genes *MDR1*, *MRP1* e *BCRP* aumentaram sua expressão conforme aumento da concentração do DHMEQ através de sua ativação por outros fatores de transcrição comprovadamente relacionados.

Na figura 4 também se observa uma grande variação entre a expressão destes genes responsáveis pelas bombas de resistência a multidrogas conforme a linhagem analisada. Essas variações encontradas nas respostas ao DHMEQ entre as linhagens poderiam ser devidas as diferenças no perfil genético e cascatas de sinalização intracelular entre uma linhagem de GBM e outra (Fukushima *et al.*, 2012).

A expressão do gene *MGMT* sob diferentes concentrações de DHMEQ foi mensurada nas linhagens celulares adultas T98G e U138-MG. Pode-se observar queda na expressão do *MGMT* em ambas as linhagens, confirmando sua relação com o NF-kappaB e, portanto, sofrendo os efeitos de sua inativação pelo DHMEQ. Entretanto, sob a maior concentração utilizada da droga (10 μ g/mL) verifica-se uma recuperação de sua expressão. Uma das possíveis

explicações está na análise da RT-qPCR dos genes relacionados à bombas de efluxo. Sob as maiores doses do tratamento a expressão de tais genes aumentou, e sabendo a funcionalidade de seus produtos, foi proposto que, provavelmente, as bombas de efluxo estivessem expelindo o DHMEQ para o exterior da célula, fazendo com que a inativação do NF-kappaB fosse suprimida e que este fator de transcrição voltasse a ativar-se, permitindo que os genes regulados por ele, como o *MGMT*, voltassem a se expressar, situação verificada na RT-qPCR deste gene.

Além da regulação de genes associados à resistência como os acima discutidos, é amplamente aceito que o NF-kappaB atua como um fator de sobrevivência e de escape à apoptose induzida por agentes que danificam o DNA, ofuscando a eficácia tanto da quimio- como da radioterapia. Embora o mecanismo que permite as drogas terapêuticas e a radiação ionizante ativar o NF-kappaB não esteja totalmente elucidado, sabe-se que as quebras simples ou duplas no DNA produzidas por tais agentes são detectadas pela proteína ATM (*ataxia telangiectasia-mutated protein*), que inicia uma cascata levando à ativação da IKK que fosforila o inibidor da IκB e permitindo a função transcricional do NF-kappaB (Bottero *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2005).

Outros inibidores deste fator de transcrição, como a Curcumina, tem demonstrado ação anti-proliferativa da inibição do NF-kappaB em GBM, principalmente pela indução de apoptose (Dhandapani *et al.*, 2007; Zanotto-Filho *et al.*, 2012). No entanto, Fukushima e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento com DHMEQ de modo isolado não é suficiente para a regressão completa de GBM em experimentos *in vivo*, e que nem todas as linhagens de GBM utilizadas no trabalho apresentaram sensibilização significativa a este tratamento, como é o caso da T98G, destacando também a necessidade da combinação desta nova droga aos tratamentos tradicionais.

Deste modo, no presente trabalho também objetivamos analisar o potencial quimio- e radiosensibilizante deste novo inibidor específico de NF-kappaB.

Primeiramente, a fim de validar os dados obtidos por RT-qPCR para o *MGMT*, as linhagens celulares T98G e U138-MG foram submetidas ao tratamento combinatório (pré-tratamento com DHMEQ e posterior exposição à TMZ) e a ação clastogênica do agente alquilante mensurada através do ensaio do cometa.

Os resultados mostraram um significativo aumento dos danos no DNA gerado por concentrações sub-tóxicas de TMZ quando combinada ao DHMEQ, indicando que o reparo dos danos no DNA foi reduzido. Sabe-se que a ativação do fator de transcrição NF-kappaB está relacionada ao aumento da expressão do *MGMT* (Lavon *et al.*, 2007). No entanto, a ordem cronológica (pré-tratamento com DHMEQ por seis horas e então aplicação de 250μM de TMZ)

garantiria a inibição do NF-kappaB e a diminuição subsequente da expressão deste gene de reparo, sensibilizando a célula.

Tal efeito quimiossensibilizante também foi confirmado pelo Ensaio de Proliferação, onde o pré-tratamento com o inibidor do NF-kappaB não só sensibilizou as células à TMZ, mas também ao VP-16, o qual é usado como droga de segunda ou terceira linha no tratamento de GBM reincidentes (Watanabe *et al.*, 2002), e em combinação com outras drogas no tratamento de GBM pediátricos (Wolff *et al.*, 2010).

O VP-16 é uma droga que atua alterando o ciclo catalítico normal da enzima Topoisomerase II (Topo II). Esta enzima, normalmente, é responsável por desfazer altos graus de helicoidização do DNA, além de torções e emaranhados, através de quebras de dupla fita seguidas por religamento das pontas soltas. A Topo II cliva o DNA em locais opostos da dupla hélice deixando duas pontas coesivas de 4 bases em cada fita clivada, nos quais ela se liga através de ligações covalentes. A partir da ligação com o cofator ATP, ocorre uma mudança conformacional na Topo II gerando a quebra de dupla fita. No final do processo, esta mesma enzima é capaz de religar o DNA. O VP-16 tem como função a formação de um complexo ternário juntamente com o DNA e a Topo II, impedindo o processo final desta enzima, isto é, não há religação das fitas de DNA, o que torna a Topo II uma toxina fisiológica (Burden & Osheroff, 1998; Montecucco & Biamonti, 2007).

Os resultados do ensaio de proliferação demonstraram relativa resistência das linhagens de GBM ao tratamento com VP-16 de modo isolado, principalmente para a linhagem T98G. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Sevim *et al.* (2011), que também apontou uma alta resistência da linhagem T98G ao tratamento com essa droga, correlacionando tal resistência com a baixa expressão da enzima Topo IIa nesta linhagem, diminuindo, portanto, seu efeito.

Entretanto, o tratamento sequencial com DHMEQ e VP-16, mostrado no trabalho aqui presente, levou a uma diminuição na sobrevivência celular e, portanto, um efeito sinérgico entre as drogas para todas as linhagens de GBM, sensibilizando inclusive a T98G, que apresentou valores de IC₅₀ < 1 para a maioria das concentrações utilizadas no tratamento sequencial.

Resultados similares já foram descritos por Morotti e colaboradores (2006) em linhagens de leucemia mieloide crônica, que ao utilizar outros inibidores de NF-kappaB (MG132, Bay11-7082, Resveratrol e expressão ectópica de formas não fosforiláveis de IκB) também obtiveram uma sensibilização das células ao tratamento com o inibidor de Topo II.

Outros estudos também demonstraram o potencial quimiossensibilizante do DHMEQ. Poma e colaboradores (2006) utilizaram o DHMEQ para sensibilizar células de câncer hepático para o tratamento com Cisplatina. Também visando melhorar o tratamento com este mesmo quimioterápico, Ruan e colegas (2006) usaram o DHMEQ em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, obtendo como resultado sensibilização destas no ensaio de proliferação. Horie e colaboradores (2006) demonstraram a ação quimiossensibilizante do DHMEQ em leucemia linfóide crônica quando combinado a Fludarabina. A combinação do DHMEQ com taxanos foi testada em câncer anaplásico de tireoide por Meng e colaboradores (2008), que também obtiveram resultados positivos. Katsman e colaboradores (2006; 2009) realizaram estudos com DHMEQ em linfomas não-Hodgkin de células-B, combinando esta nova droga com quimioterápicos como Cisplatina, Vincristina e Etoposide, todos apresentando quimiossensibilização; também verificaram a ação sensibilizante do DHMEQ para a Cisplatina em células cancerosas de próstata. Horiuchi e colaboradores (2008), trabalhando com linhagens de sarcoma sinovial, demonstraram efeitos aditivos entre o DHMEQ e os quimioterápicos Doxorrubicina e Vincristina através de ensaios de proliferação. Castro-Gamero e colaboradores (2012) demonstraram efeito sinérgico entre o DHMEQ e as drogas Cisplatina, Doxorrubicina e Metotrexato em linhagens de osteossarcoma. Em conjunto, estes trabalhos demonstram a possível relevância clínica do DHMEQ, principalmente de seu efeito quimiossensibilizante sobre células resistentes aos tratamentos convencionais.

Ainda visando analisar o potencial do DHMEQ quando combinado a terapias tradicionais, foi realizado o ensaio clonogênico, no qual foi aplicado o tratamento com DHMEQ de modo combinado sequencialmente a radiação ionizante. Para este ensaio as células foram pré-tratadas com DHMEQ na concentração de 10µg/mL por 24h e então irradiadas nas doses de 2Gy, 4Gy e 6Gy.

Nossos resultados apontaram uma radiosensibilização das células pré-tratadas com o DHMEQ quando comparadas ao controle apenas irradiado, isto é, a fração de células afetadas pela radiação ionizante aumentou nos casos de pré-tratamento. As duas linhagens pediátricas apresentaram inclusive ausência completa de colônias sob algumas doses de radiação, explicitando a alta capacidade radiosensibilizante do DHMEQ.

Alguns artigos demonstram uma relação entre a radiorresistência e a expressão do fator de transcrição NF-kappaB em diversos tipos tumorais. Crittenden e colaboradores (2012) mostraram maior eficácia da radioterapia de adenocarcinoma pancreático em ratos *knockout* para NF-kappaB quando comparados ao controle selvagem. Experimentos *in vitro* também demonstraram que uma super-ativação do NF-kappaB está relacionada ao perfil de

radiorresistência, e a inibição deste fator de transcrição de interesse por diferentes drogas sensibilizam linhagens celulares de vários tipos de câncer a radioterapia, como câncer de próstata (Sun *et al.*, 2007; Ghotra *et al.*, 2013), leucemia linfoblástica (Chin *et al.*, 2005), câncer oral (Tamatani *et al.*, 2013) e linfoma de Burkitt (Qiao *et al.*, 2013). Tais trabalhos demonstram que em diversos tipos tumorais a inibição do NF-kappaB pode ser uma possibilidade para melhorar os efeitos da radiação, comprovando a relação de sua ativação à radiorresistência.

Uma radiosensibilização induzida especificamente pelo DHMEQ foi demonstrada no trabalho de Kozakai e colaboradores (2012) em câncer de próstata. Através de ensaios clonogênicos com duas linhagens, este estudo comprovou que a inativação do NF-kappaB pelo pré-tratamento de 6h com DHMEQ aumenta a sensibilidade das linhagens celulares a radiação na dose de 4Gy mesmo nas menores concentrações de DHMEQ (2,5 e 5 µg/mL). Além disso, experimentos *in vivo* demonstraram redução significativa no volume do tumor nos casos de tratamento combinado de DHMEQ e radiação ionizante.

Com o atual progresso das pesquisas sobre vias de sinalização e características moleculares do GBM, assim como da busca por novos alvos terapêuticos, sabemos hoje que as monoterapias tem um efeito limitado no tratamento, fazendo com que a combinação de drogas seja um ponto crítico na evolução do tratamento desta neoplasia (Perry *et al.*, 2012).

Loeb (2011) afirma ser cada vez mais eminente a necessidade de tratamentos combinados, justificando que apesar do tumor conter células resistentes a qualquer quimioterápico isolado, dificilmente alguma célula será resistente a múltiplas drogas. Baseando-se nesta informação e sabendo da heterogeneidade molecular apresentada pelos GBM, assim como sua alta resistência ao tratamento com drogas isoladas, torna-se clara a necessidade de tratamentos combinados também para este tipo tumoral, sendo a combinação com o tratamento padrão a mais reconhecida atualmente (Perry *et al.*, 2012).

Assim, o trabalho aqui presente vem a acrescentar aos dados literários não só a correlação do NF-kappaB com a quimio- e radiorresistência em GBM, mas também demonstra o potencial do DHMEQ como uma droga adjuvante no tratamento deste tumor tão devastador, ao diminuir o limiar de resistência aos tratamentos atualmente disponíveis.

Conclusão

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que o DHMEQ pode atuar como um composto sensibilizante aos tratamentos convencionais de GBM, como o uso da TMZ e radioterapia, além do quimioterápico de segunda linha VP-16. Os estudos *in vitro* demonstraram melhor eficácia quando a combinação era realizada de modo sequencial, indicando a inativação do NF-kappaB e seus genes alvos, isto é, impossibilitando a célula de ativar mecanismos de escape aos tratamentos tradicionais, como o reparo dos danos causados pela TMZ. Apoiados por dados da literatura, nossos estudos comprovaram a ação quimio- e radiosensibilizante do DHMEQ, indicando ação sinérgica a esses tratamentos e ressaltando a possibilidade de uso clínico desta nova droga.

Referências

Bibliográficas

- BEDNARSKI, B.K., BALDWIN, A.S.J., KIM, H.J. (2009). Addressing Reported Pro-Apoptotic Functions of NF- κ B: Targeted Inhibition of Canonical NF- κ B Enhances the Apoptotic Effects of Doxorubicin PLoS ONE; doi:10.1371/journal.pone.0006992.
- BOTTERO, V. *et al.* (2001). Activation of Nuclear Factor κ B through the IKK Complex by the Topoisomerase Poisons SN38 and Doxorubicin: A Brake to Apoptosis in HeLa Human Carcinoma Cells. *Cancer Research*; 61:7785–7791.
- BURDEN, D.A., OSHEROFF, N. (1998). Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1400:139-154.
- BREEDVELD, P., BEIJNEN, J.H., SCHELLENS, J.H.M. (2006). Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *TRENDS in Pharmacological Sciences*; doi:10.1016/j.tips.2005.11.009.
- BRNADES, A.A. *et al.* (2008). Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 67:139–152.
- CABANAS, R. *et al.* (2013). Treatment of children with high grade glioma with nimotuzumab: a 5-year institutional experience. *MAbs*; 5(2):202-7.
- CASTRO-GAMERO, A.M., *et al.* (2012). Inhibition of nuclear factor- κ B by dehydroxymethylepoxyquinomicin induces schedule-dependent chemosensitivity to anticancer drugs and enhances chemoinduced apoptosis in osteosarcoma cells. *Anti-Cancer Drugs*; 23:638–650.
- CASTRO-GAMERO, A.M. *et al.* (2013). Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of Sp1-mediated survivin transcription, induces apoptosis and acts synergistically with chemo-radiotherapy in glioblastoma cells. *Investigational New Drugs*; 31(4): 858-870.
- CHALMERS, A.J. *et al.* (2009). Cytotoxic Effects Of Temozolomide And Radiation Are Additive- And Schedule-Dependent. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*; 75: 1511–1519.
- KNIZHNIK, A.V. *et al.* (2013). Survival and Death Strategies in Glioma Cells: Autophagy, Senescence and Apoptosis Triggered by a Single Type of Temozolomide-Induced DNA Damage. PLoS ONE; doi:10.1371/journal.pone.0055665.
- CHO, S. *et al.* (2011). Notch1 regulates the expression of the multidrug resistance gene ABCC1/MRP1 in cultured cancer cells. *PNAS*; 108(51): 20778–20783.
- CRITTENDEN, M.R. *et al.* (2012). Expression of NF- κ B p50 in Tumor Stroma Limits the Control of Tumors by Radiation Therapy. PLoS ONE; doi:10.1371/journal.pone.0039295.

- CHIN, C. et al. (2005). Radiosensitization by targeting radioresistance-related genes with protein kinase A inhibitor in radioresistant cancer cells. *EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE*; 37(6): 608-618.
- DEMEULE, M. et al. (2001). Expression of multidrug-resistance p-glycoprotein (mdr1) in human brain tumors. *Int. J. Cancer*; 93:62–66.
- BRANN, D.W. (2007). Curcumin suppresses growth and hemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. *JNeurochem.*; 102(2):522-38.
- EMDAD, M. et al. (2006). Activation of the Nuclear Factor kB Pathway by Astrocyte Elevated Gene-1: Implications for Tumor Progression and Metastasis. *Cancer Res*;66:1509-1516.
- EZAKI, T. et al. (2011).Molecular characteristics of pediatric non-ependymal, non-pilocytic gliomas associated with resistance to temozolomide. *Mol Med Rep.*;4(6):1101-1105.
- FELIX, F.H.C. et al. (2013). Survival of children with malignant brain tumors receiving valproate: a retrospective study *Childs Nerv Syst*;29:195–197.
- FERGUSON, S.D. (2011). Malignant Gliomas: Diagnosis and Treatment. *Dis Mon*;57:558-569.
- FUKUSHIMA, T. et al. (2012). Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin, a small molecule inhibitor of nuclear factor-kB, on glioblastoma. *Neuro-Oncology* 14(1):19–28.
- GASPAR, N. et al. (2010). MGMT- IndependentTemozolomide Resistance in Pediatric Glioblastoma Cells Associated with PI3-Kinase – MediatedHOX/Stem Cell Gene Signature. *Cancer Res*; 70:9243-9252.
- GILMORE, T.D., Herscovitch, M. (2006). Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene*;25(51):6887-99.
- GHOTRA, V.P. et al. (2013). Targeted radiosensitization in prostate cancer. *Curr Pharm Des.*;19(15):2819-28.
- GROOT, J., MILANO, V. (2009). Improving the prognosis for patients with glioblastoma: the rationale for targeting Src. *J Neurooncol* ;95:151–163.
- HANDE, K.R. et al. (1998). Etoposide: Four Decades of Development of aTopoisomerase II Inhibitor. *European Journal of Cancer*; 34:1514-1521.
- HENTSCHEL,S.J., SAWAYA,R. (2003). Optimizing Outcomes With Maximal Surgical Resection of Malignant Gliomas. *Cancer Control*;10:109-114.
- HO,W.C., DICKSON,K.M., BARKER, P.A. (2005). Nuclear Factor-KB Induced by Doxorubicin Is Deficient in Phosphorylation and Acetylation and Represses Nuclear Factor-KB– Dependent Transcription in Cancer Cells. *Cancer Res*; 65(10): 4273-81.

- HORIE, R. et al. (2006). DHMEQ, a new NF- κ B inhibitor, induces apoptosis and enhances fludarabine effects on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*; 20: 800–806.
- HORIGUCHI, Y. et al. (2003). Antitumor effect of a novel nuclear factor-kappa B activation inhibitor in bladder cancer cells. *Expert Rev Anticancer Ther*;3(6):793-798.
- HORIUCHI, K. et al. (2008). Growth suppression and apoptosis induction in synovial sarcoma cell lines by a novel NF- κ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ). *Cancer Letters* 272: 336–344.
- IACOB G., DINCA, E. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life*. 2:386-93.
- INOUE, J. et al. (2006). NF- κ B activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci*; 98: 268–274.
- KATSMAN, A., UMEZAWA, K., BONAVIDA, B. (2007). Reversal of resistance to cytotoxic cancer therapies: DHMEQ as a chemo-sensitizing and immuno-sensitizing agent. *Drug Resistance Updates*; 10:1–12.
- KATSMAN, A., UMEZAWA, K., BONAVIDA, B. (2009). Chemosensitization and Immunosenitization of Resistant Cancer Cells to Apoptosis and Inhibition of Metastasis by the Specific NF- κ B Inhibitor DHMEQ. *Current Pharmaceutical Design*; 15: 792-808.
- KERASI, S. (2011). Understanding Glioblastoma Tumor Biology: The Potential to Improve Current Diagnosis and Treatments. *Seminars in Oncology*;38:S2-S10.
- KHASRAW, M., LASSMAN, A.B. (2010). Advances in the Treatment of Malignant Gliomas. *Curr Oncol Rep*;12:26–33.
- KIKUCHI, E. et al. (2003) Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor kappaB inhibitor in nude mice. *Cancer Res*; 63: 107–110.
- KOZAKAI, N. et al. (2012). Enhancement of radiosensitivity by a unique novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ, in prostate cancer. *British Journal of Cancer*; 104: 652–657.
- LABIALLE, S. et al. (2002). Transcriptional Regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochemical Pharmacology*; 64:943-948.
- LACKNER, M., WILSON, T.R., SETTLEMAN, J. (2012). Mechanisms of Acquired Resistance to Targeted Cancer Therapies. *Future Oncol.*;8(8):999-1014.
- LAVON, I. et al. (2007) Novel Mechanism whereby Nuclear Factor KB Mediates DNA Damage Repair through Regulation of O6 Methylguanine- DNA-Methyltransferase. *Cancer Res* 67:8952-8959.

- LIMA, F.R.S. et al. (2012). Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1826:338–349.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*; 25(4):402–408.
- LOEB, L.A. (2011). Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nature*; 11:450–457.
- LOUIS, D.N. et al. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*; 114:97–109.
- MATSUMOTO, N. et al. (2000) Synthesis of NF-kappaB activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C. *Bioorg. Med. Chem. Lett*; 10: 865–869.
- MENG, Z. et al. (2008). Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a Novel Nuclear Factor- κ B Inhibitor, Enhances Antitumor Activity of Taxanes in Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *Endocrinology*; 149(11):5357–5365.
- MONTECUCCO, A., BIAMONTI, G. (2007). Cellular response to Etoposide treatment. *Cancer Letters*; 252:9–18.
- MOROTTI, A. et al. (2006). NF- κ B Inhibition as a Strategy to Enhance Etoposide-Induced Apoptosis in K562 Cell Line. *American Journal of Hematology*; 81:938–945.
- NAGAI, S. et al. (2002). Aberrant nuclear factor- κ B activity and its participation in the growth of human malignant astrocytoma. *J Neurosurg*; 96:909–917.
- NATARAJAN, K. et al. (2012). Role of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Cancer Drug Resistance. *Biochem Pharmacol*; 83(8): 1084–1103.
- NAUGLER, W.E., KARIN, M. (2008) NF- κ B and Cancer - Identifying Targets and Mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 18(1): 19–26.
- OHGAKI, H., KLEIHUES, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci*; 100: 2235–2241.
- PERRY, J. et al. (2012). Novel Therapies in Glioblastoma. *Neurology Research International*; doi:10.1155/2012/428565.
- POMA, P. et al. (2006). Antitumor effects of the novel NF- κ B inhibitor Dehydroxymethylepoxyquinomicin on human hepatic cancer cells: Analysis of synergy with cisplatin and of possible correlation with inhibition of pro-survival genes and IL-6 production. *International Journal of Oncology*; 28: 923–930.
- QIAO, Q., JIANG, Y., LI, G. (2013). Inhibition of the PI3K/AKT-NF- κ B Pathway With Curcumin Enhanced Radiation-Induced Apoptosis in Human Burkitt's Lymphoma. *J Pharmacol Sci*; 121: 247 – 256.

- RUAN, H. et al. (2006). Effects of a Novel Nf- κ B Inhibitor, Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), on Growth, Apoptosis, Gene Expression, and Chemosensitivity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *HEAD & NECK*; DOI: 10.1002/hed.20304.
- SARKARIA, J.N. et al. (2008) . Mechanisms of Chemoresistance to Alkylating Agents in Malignant Glioma. *Clin Cancer Res*; 14:2900-2908.
- SCHACH, M. et al. (2009). A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Annals of Oncology* 20: 175–181.
- SINGH, N.P. et al. (1998). A simple technique for quantitation low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp Cell Res.*; 175(1): 184-191.
- SPILLER, S.E. et al. (2011). Inhibition of nuclear factor κ -B signaling reduces growth in medulloblastoma in vivo. *BMC Cancer* , 11:136.
- STARENKI, D.V. et al. (2004). Induction of Thyroid Cancer Cell Apoptosis by a Novel Nuclear Factor κ B Inhibitor, Dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Clin Cancer Res*;10:6821-6829.
- SUN, Y. et al. (2007). The radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells is mediated by nuclear factor- κ B inhibition and enhanced by the presence of PTEN. *Mol Cancer Ther*;6:2477-2486.
- TAMATANI, T. et al.(2013). Bortezomib-enhanced radiosensitization through the suppression of radiation-induced nuclear factor- κ B activity in human oral cancer cells. *Int J Oncol*;42(3):935-44.
- TRAN, B., ROSENTHAL, M.A. (2010). Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *Journal of Clinical Neuroscience* 17:417–421.
- TRIVED, R.N. et al. (2005). The Role of Base Excision Repair in the Sensitivity and Resistance to Temozolomide-Mediated Cell Death. *Cancer Res*;65:6394-6400.
- UMEZAWA, K. (2006). Inhibition of tumor growth by NF- κ B inhibitors. *Cancer Sci*; 97: 990–995.
- UMEZAWA, K. (2011). Possible role of peritoneal NF- κ B in peripheral inflammation and cancer: Lessons from the inhibitor DHMEQ . *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 65: 252–259.
- WANG,C., MAYO,M.W., BALDWIN,A.S.J. (1996). TNF- and Cancer Therapy-Induced Apoptosis: Potentiation by Inhibition of NF-KB. *Science*; 274:784-786.
- WATANABE, K. et al. (2002). Combination Chemotherapy Using Carboplatin (JM-8) and Etoposide (JET Therapy) for Recurrent Malignant Gliomas:A Phase II Study. *Acta Neurochir*; 144: 1265–1270.

- WATANABE, M. et al. (2005a) A novel NF- κ B inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF- κ B activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 114: 32–38.
- WATANABE, M. et al. (2005b). Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF- κ B, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood*; 106: 2462–2471.
- WOLFF, J.E.A. et al. (2010). Intensive Chemotherapy Improves Survival in Pediatric High-Grade Glioma After Gross Total Resection: Results of the HIT-gBM-c Protocol. *Cancer*; DOI: 10.1002/cncr.24730.
- ZHANG, X. et al. (2011). Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating β -catenin and NF- κ B signaling via AKT activation. *Cancer Sci*; DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02154.x.
- ZANOTTO-FILHO, A. et al. (2011). NF κ B inhibitors induce cell death in glioblastomas. *Biochemical Pharmacology*; 81: 412–424.
- ZANOTTO-FILHO, A. et al. (2012). The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma. *J Nutr Biochem*; 23(6):591-601.