



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

GUSTAVO HENRIQUE CARDOSO GUIMARÃES

**O composto 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, LQB-223, modula o microRNA-7
e a via das MAP kinases ERK1/ERK2 em linhagens de glioblastoma com
diferentes perfis de radiorresistência**

Orientadora: Profa. Dr^a. Raquel C. Maia

**RIO DE JANEIRO
2016**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

GUSTAVO HENRIQUE CARDOSO GUIMARÃES

**O composto 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, LQB-223, modula o microRNA-7
e a via das MAP kinases ERK1/ERK2 em linhagens de glioblastoma com
diferentes perfis de radiorresistência**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Oncologia

Orientadora: Profa. Dr^a. Raquel C. Maia

**RIO DE JANEIRO
2016**

G963c Guimarães, Gustavo Henrique Cardoso.

O composto 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, LQB-223, modula o microRNA-7 e a via das MAP kinases ERK1/ERK2 em linhagens de glioblastoma com diferentes perfis de radiorresistência / Gustavo Henrique Cardoso Guimarães. – Rio de Janeiro, 2016.

104 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2016.

Orientador: Raquel C. Maia.

1. Glioblastoma. 2. MAP Quinases Reguladas por Sinal Extracelular. 3. Micro RNA-7. 4. Radiorresistência. I. Maia, Raquel C. (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99481



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

GUSTAVO HENRIQUE CARDOSO GUIMARÃES

**O composto 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, LQB-223, modula o microRNA-7
e a via das MAP kinases ERK1/ERK2 em linhagens de glioblastoma com
diferentes perfis de radioresistência**

ORIENTADORA: Profa. Dr^a. Raquel C. Maia

Rio de Janeiro, 23 de maio de 2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Leonardo Augusto Karam Teixeira - Instituto Nacional de Câncer
Prof. Dr. Martin Hernan Bonamino – Instituto Nacional de Câncer
Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti – Universidade Federal do Rio de Janeiro
Profa. Dra. Sheila Coelho Soares Lima – Suplente I – Instituto Nacional de Câncer
Profa. Dra. Monica Macedo Bastos – Suplente II – Fundação Oswaldo Cruz

**RIO DE JANEIRO
2016**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

O composto 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, LQB-223, modula o microRNA-7 e a via das MAP kinases ERK1/ERK2 em linhagens de glioblastoma com diferentes perfis de radioresistência

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GUSTAVO HENRIQUE CARDOSO GUIMARÃES

RESUMO

O Glioblastoma (GB) é um astrocitoma altamente agressivo, de grau IV, cujos pacientes apresentam média de sobrevida global de 12 meses. O tratamento padrão baseia-se em uma combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia com temozolamida. O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) exerce grande contribuição para a carcinogênese, evolução e resposta ao tratamento em pacientes com GB. Por isso, a sua expressão e suas vias de sinalização, como a via das MAP kinases (MAPK) ERK1/ERK2, encontram-se altamente desreguladas no GB. A inibição da expressão gênica do EGFR e Raf1, pelo supressor tumoral miR-7, é capaz de regular essa via de sinalização em múltiplos níveis resultando na sensibilização de linhagens celulares à radiação ionizante. Apesar do papel do miR-7 na sensibilização, os pacientes podem adquirir resistência ao tratamento. Portanto, o estudo de novos compostos capazes de modular a via de sinalização do EGFR torna-se importante. O objetivo do estudo é caracterizar o perfil de radioresistência, e avaliar o efeito antitumoral e o mecanismo de ação do composto LQB-223 nas linhagens celulares de GB humano: A172 (PTEN mutado), T98G (TP53 e PTEN mutados) e U251 (TP53, EGFR e PTEN mutados). A fim de avaliar o efeito antitumoral do LQB-223 utilizamos os ensaios de viabilidade celular por MTT, de formação de colônias, fragmentação do DNA, perfil do ciclo celular e a exposição de fosfaditilserina por citometria de fluxo. O perfil de resposta das linhagens à radiação foi avaliado pelo ensaio de fragmentação do DNA e de ciclo celular. A expressão do miR-7 foi avaliada por RT-PCR, e a de ERK, p-ERK, Ras, Caspase-3, Caspase-3 clivada, p-H2AX pela técnica de Western blotting. As linhagens T98G e A172 apresentaram um acúmulo expressivo de células em G2/M após a exposição às doses de radiação de 8, 16 e 24Gy. Estas doses induziram um aumento na fragmentação do DNA apenas nas linhagens U251 e T98G. Nossos dados apontam para a maior resistência das linhagens estudadas às baixas doses de radiação ionizante enquanto a linhagem A172 mostrou-se mais resistente a todas as doses utilizadas. O composto LQB-223 reduziu a viabilidade e a proliferação celular, induziu acúmulo na fase G2/M do ciclo celular, aumentou a fragmentação do DNA e a taxa da morte celular por apoptose nas linhagens de GB avaliadas. Os efeitos antitumorais induzidos pelo LQB-223 podem ser parcialmente explicados pelo aumento na expressão do miR-7, bem como pela diminuição na fosforilação da proteína ERK e da expressão da forma total da proteína Ras. Resultados preliminares na linhagem T98G mostraram um aumento na fosforilação da proteína H2AX sugerindo que o LQB-223 induz quebra de dupla fita do DNA. Em conjunto, nossos resultados mostram que o LQB-223 possui um grande potencial antitumoral tanto nas linhagens de GB sensíveis quanto nas resistentes à radiação ionizante e que as alterações observadas podem ser explicadas pela inibição em diferentes níveis da via do EGFR, via aumento do miR-7.

Palavras-chave: Radiorresistência; LQB-223; MAP kinases ERK1/ERK2; microRNA-7; Glioblastoma



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is a highly aggressive grade IV astrocytoma. Patients with GB present 12 months average overall survival. The standard treatment is based on a combination of surgery, radiotherapy and temozolamide combined chemotherapy. The epidermal growth factor receptor (EGFR) plays a major role in the carcinogenesis, evolution and response to treatment for patients with GB. Therefore, EGFR and its pathways, like MAP kinases (MAPK) ERK1/ERK2, are highly overexpressed in GB. The tumor suppressor miR-7 is able to inhibit the genic expression of EGFR and Raf1 regulating multiple levels of its signaling cascade resulting in increased sensibility to ionizing radiation in GB cell lines. However, patients acquire resistance to the treatment, which explains the low survival rate for GB. This justifies the need to research new drugs capable of modulating EGFR expression. This project aims at characterizing the radio-resistance, evaluating its effect on tumor and studying LQB-223 mechanism on the GB cell lines: A172 (PTEN mutated), T98G (TP53 and PTEN mutated) and U251 (*TP53*, *EGFR* and *PTEN* mutated). MTT cell viability assay were used to access LQB-223 ability to tumor formation, DNA fragmentation, cell cycle and exposure to fosfatidilserine through flow-cytometry. The cell lines response to radiation was evaluated by DNA fragmentation assay and cell cycle. RT-PCR was used to evaluate miR-7 expression, while Western *blotting* was used for ERK, p-ERK, Ras, Caspase-3, Caspase-3 cleaved and p-H2AX. T98G and A172 showed an expressive G2/M cell accumulation after exposure to de 8, 16 e 24Gy doses of radiation. These doses induced an increased DNA fragmentation only in U251 and T98G cell lines. All cell lines were more resistant to low ionizing radiation and A172 was also resistant to high doses of radiation. LQB-223 was able to reduce viability and cell proliferation, lead to an accumulation in the G2/M phase of the cell cycle, increased DNA fragmentation and cell apoptosis in the GB lines studied. Increased miR-7 expression, reduction of ERK protein phosphorylation and total Ras expression could partially explain LQB-223 anti-tumor effect. Recent preliminary studies of T98G cell line have shown an increase in H2AX phosphorylation suggesting that LQB-233 induces a double break in the DNA strand. Taken together our data show that LQB-223 has a great anti-tumor potential, not only on the ionizing radiation sensitive but also on the resistant GB cell lines. Also the observed changes may suggest different levels of EGFR inhibition perhaps through miR-7 increase.

Palavras-chave: Radio-resistance; LQB-223; MAP kinases ERK1/ERK2; microRNA-7; Glioblastoma

À minha família e namorada
Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha família por sempre terem incentivado os meus estudos. Aos meus pais por todo apoio nos bons e maus momentos. À minha irmã que vem me apoiando muito nos últimos tempos, uma conselheira maravilhosa. À minha tia Maria Lúcia e à minha avó Yvonne, pois sem o apoio delas nunca conseguiria ter chegado onde estou. Aos meus padrinhos que são uma inspiração de companheirismo. Nessa caminhada a ausência aumenta, mas todos possuem muita importância em minha vida.

À minha orientadora, Dr^a Raquel C. Maia, pela orientação e auxílio em todos os momentos. Obrigado por acreditar em minha capacidade e incentivar a minha chegada neste momento.

À minha amiga, tutora e parceira científica, Paula Sabbo. Agradeço por todas as discussões, pelos experimentos em conjunto, pelo conhecimento compartilhado e pelos conselhos. Sua ajuda e orientação foram essenciais em minha formação.

À minha namorada e companheira de vida, Thaís Hancio. Agradeço o seu companheirismo e o seu amor. Além das horas dedicadas na adaptação das figuras dessa dissertação. Meus dias continuam sendo melhores na sua presença.

À amiga Flávia Vasconcelos, por toda a ajuda nas análises dos experimentos envolvendo a técnica de citometria de fluxo. Além do cuidado de uma mãe, sempre preocupada com os meus erros e estendendo ajuda.

Às amigas Gabriela, Deborah e Lauana, pelos sorrisos distribuídos e pela preocupação com meu bem estar. Obrigado por atuar meu mau humor.

A todos os colegas do Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular que tornam o ambiente de trabalho um lugar agradável e divertido. Obrigado por cada conhecimento compartilhado e conselhos distribuídos.

Ao amigo Rodrigo Peres, pela amizade em todos esses vinte anos. Agradeço a preocupação e todos os momentos compartilhados.

Aos meus amigos biólogos e companheiros de formação, Clarissa, Daniel, Isabel, Junior, Rafael, Bruna, Nicole, Fernanda e Bruno. Apesar da distância sempre arrumamos um jeito de nos encontrar. Tenho um orgulho imenso de cada um de vocês. Obrigado por todo o carinho.

À Karina Lani por toda a ajuda na aquisição dos experimentos com citometria, além do tempo despendido no ensino da aquisição e análise da técnica.

Aos colegas do Curso de Verão, e todos que participaram da representação discente, principalmente o Bruno Lopes. Obrigado pelo aprendizado.

Aos funcionários do Laboratório do Fracionamento por toda ajuda com os experimentos envolvendo a radiação ionizante.

Aos funcionários do INCA que de alguma forma contribuíram com o meu trabalho.

Aos professores dos cursos de Pós-Graduação pelo conhecimento adquirido.

Aos membros da Pós-Graduação do INCA por toda atenção.

Aos membros da banca pelo aceite do convite e toda a compreensão com os pedidos de adiamento de defesa.

As agências de fomento CAPES e FAPERJ Nota 10 pelo auxílio no pagamento de minha bolsa de estudos.

As agências de fomento CNPq, FAPERJ, Programa de Oncobiologia-UFRJ/FAF pelo apoio financeiro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Fatores de riscos não-genéticos para os gliomas.....	04
Tabela 4.1. Densidade celular utilizada nos experimentos.....	37
Tabela 4.2. Autenticação das linhagens celulares de GB pelo perfil STR, avaliado por PCR.....	39
Tabela 4.3. Anticorpos primários utilizados no estudo do mecanismo de ação do LQB-223.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Origem dos glioblastomas (GBs) primários e secundários e suas principais diferenças quanto ao perfil genético.....	10
Figura 1.2. Tratamento padrão administrado para os pacientes recém-diagnosticados com glioblastoma (GB)	12
Figura 1.3. Alterações genéticas frequentes na via de sinalização RTK/RAS/PI-3K	20
Figura 1.4. Vias de biogênese dos microRNAs e o seu mecanismo de ação.....	25
Figura 1.5. Estrutura molecular do novo composto sintético LQB-223.....	32
Figura 3.1. Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo	35
Figura 5.0. Fragmentação do DNA da linhagem U251 após exposição à radiação ionizante, analisada por citometria de fluxo.....	52
Figura 5.1. Histograma representativo do ensaio de ciclo celular das linhagens de glioblastoma T98G e A172 após exposição à radiação ionizante, avaliado por citometria de fluxo.....	54
Figura 5.2. Fragmentação do DNA das linhagens T98G e A172, após exposição à radiação ionizante, analisada por citometria de fluxo.....	55
Figura 5.3. Quantificação relativa dos níveis de miR-125b, na linhagem U251 após exposição a radiação ionizante, avaliado por qRT-PCR.....	57
Figura 5.4. Resultados preliminares do efeito antitumoral do novo composto sintético LQB-223, na linhagem U251	58
Figura 5.5. Morfologia celular das linhagens de glioblastoma U251, T98G e A172 após incubação com o novo composto LQB-223, obtida por microscópio óptico.....	61

Figura 5.6. Viabilidade celular das linhagens T98G e A172 após incubação com o novo composto LQB-223, avaliada pelo ensaio de MTT.....	63
Figura 5.7. Ensaio clonogênico de formação de colônias da linhagem U251 e T98G após a incubação com o novo composto sintético LQB-223.....	65
Figura 5.8. Histograma representativo do ensaio de ciclo celular das linhagens T98G e A172 após incubação com o novo composto LQB-223, avaliado por citometria de fluxo.....	66
Figura 5.9. Fragmentação do DNA da linhagem T98G e A172 após incubação com o novo composto sintético LQB-223, avaliada por citometria de fluxo.....	67
Figura 5.10. Morte celular por apoptose da linhagem A172 após incubação com o composto LQB-223, avaliada por citometria de fluxo.....	69
Figura 5.11. Ativação da proteína caspase-3 na linhagem U251 após incubação com o composto LQB-223, avaliado por WB.....	70
Figura 5.12. Aumento da p-H2AX na linhagem T98G após incubação com o novo composto sintético LQB-223, avaliado por WB.....	71
Figura 5.13. Modulação da via das MAP kinases ERK1/ERK2 nas linhagens U251 e T98G após incubação com o novo composto sintético LQB-223, avaliado por WB.....	73
Figura 5.14. Quantificação relativa dos níveis de microRNA, nas linhagens de GB U251, T98G e A172 após incubação com o novo composto sintético LQB-223, avaliado por qRT-PCR.....	75
Figura 6.1. Resumo das alterações induzidas pelo LQB-223 nas linhagens de GB.....	96
Figura 6.2. Mecanismo de ação proposto sobre o modo de atuação do LQB-223 nas linhagens de GB.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Cassete de ligação a ATP
A488	Alexa Fluor [®] 488
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
ATM	Ataxia telangiectasia mutata
ATR	Ataxia telangiectasia relacionada a Rad3
AKT	Proteína kinase B
Bak1	Assassino 1 antagonista de Bcl-2
Bax	Proteína x associada a Bcl-2
Bcl-2	<i>B- cell lymphoma 2</i>
BCNU	1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosuréia (carmustina)
BCRP	Proteína de resistência em câncer de mama
BHE	Barreira hemato-encefálica
BSA	Albumina sérica bovina
CCNU	Lomustina
cDNA	DNA complementar
CDKN2B	Inibidor de ciclina-dependente quinase 2B
Chk1 e Chk2	Checkpoint kinase 1 e 2
C _T	Ciclo limite
DMEM/F12	Meio de Dulbecco modificado por Eagle:Mistura Nutriente F-12
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
ERK	Proteína regulada por sinais extracelulares
FoxP3	Fator de transcrição forkhead box P3
Fak	Kinase de adesão focal
FS	Fosfatidilserina
G0	Gap 0
G1	Gap 1
G2/M	Gap 2/ Mitose

GB	Glioblastoma
GTP	Guanosina trifosfato
HC1	Hospital do Câncer 1
HR	Recombinação Homóloga
HRP	Enzima peroxidase de rábano silvestre
Hsc70	Proteína <i>Heat Shock</i> 70
H2AX	Histona H2AX
IDH1	Isocitrato desidrogenase humana 1
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPPN	Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais
LHOCM	Laboratório de Hemato-Oncologia celular e molecular
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LOH	Perda de heterozigose
LQB	Laboratório de Química Bio-orgânica
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MGMT	O-6-metilguanina-DNA-metiltransferase
miRNA	microRNA
miR-7	microRNA-7
miR-125b	microRNA-125b
mRNA	RNA mensageiro
<i>MYC</i>	Homólogo de Oncogene viral v-myc de mielocitomatose
MRP	Proteína relacionada a multirresistência
MTIC	5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
ncRNA	RNA não-codificante
NF1	Neurofibromatose tipo 1
NFκB	Fator nuclear potencializador do gene polipeptídeo kappa leve em células B
NGS	Sequenciamento de nova geração
NHEJ	Recombinação não-homóloga
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PDGFRA	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas tipo Alfa
Pgp	Glicoproteína P
PI	Iodeto de propídeo
PI3K	<i>fosfatidilinositol-3-quinase</i>
PHLDB1	Domínio plecstrina <i>homology-like</i>
Pre-miRNA	RNA precursor
Pri-miRNA	RNAs precursores primários
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
PCV	Protocolo contendo procarbazona, CCNU e vincristina
PUC	Pontifícia Universidade Católica
Puma	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Raf-1	RAF proto-oncogene serina / treonina-kinase
Ras	homólogo ao oncogene viral <i>v-Ha-ras</i> de sarcoma de rato
Rb1	Proteína retinoblastoma 1
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RTEL1	Regulador de alongamento de telomerase helicase
S	Síntese
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
STR	<i>short tandem repeats</i>
TBS	Salina tamponada com Tris
TBST	TBS Tween
TCGA	Atlas do Genoma do Câncer
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
TERC	Componente de RNA da telomerase
TERT	Transcriptase reversa de telomerase
TGF- α	Fator de crescimento transformante alpha
TKI	Inibidor de tirosina kinase
TMZ	Temozolomida

™	Marca registrada
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WB	Western <i>blotting</i>
XIAP	Inibidor de apoptose ligado ao X

SUMÁRIO

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de abreviaturas e siglas.....	xi
1. Introdução.....	01
1.1 Gliomas.....	01
1.1.1 Etiologia e fatores de risco	01
1.1.2 Diagnóstico.....	04
1.1.3 Classificação.....	05
1.1.4 Glioblastoma (GB).....	06
1.1.4.1 Alterações genéticas.....	07
1.1.4.2 Classificação clínica.....	08
1.1.4.3 Classificação molecular.....	10
1.1.4.4 Tratamento.....	12
1.1.4.5 Resistência ao tratamento.....	15
1.2 Receptores Tirosina Quinases e a via RAS/RAF/MEK/ERK.....	19
1.3 microRNAs.....	23
1.3.1 Organização genômica, biogênese e função.....	24
1.3.2 microRNAs e o câncer.....	26
1.3.2.1 microRNA-125b	27
1.3.2.2 microRNA-7	28
1.4 Novo composto sintético com atividade antitumoral.....	30
2. Objetivos.....	34
2.1 Geral.....	34

2.2 Específicos.....	34
3. Desenho experimental.....	35
4. Material e Métodos.....	36
4.1 Perfil e manejo das linhagens celulares de GB.....	36
4.2 Autenticação e controle de qualidade das linhagens celulares de GB.....	38
4.3 Exposição à radiação ionizante.....	40
4.4 Tratamento das linhagens de GB com o novo composto, LQB-223.....	40
4.5 Avaliação da morfologia celular em microscópio óptico invertido.....	41
4.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	41
4.7 Formação de colônias pelo ensaio clonogênico.....	42
4.8 Ensaio do ciclo celular e da fragmentação do DNA.....	43
4.9 Ensaio de Anexina V/PI.....	44
4.10 Análise da expressão protéica por Western blotting (WB).....	45
4.11 Detecção dos níveis de expressão dos microRNA-7 e 125b.....	48
4.12 Análise estatística.....	51
5. Resultados.....	52
5.1 Descrição do perfil de radiorresistência.....	52
5.1.1 Alteração do perfil do ciclo celular e da fragmentação do DNA nas linhagens de GB expostas a radiação ionizante.....	53
5.1.2 Modulação do microRNA-125b, na linhagem U251, após exposição a radiação ionizante.....	56
5.2 Novo composto sintético LQB-223: Avaliação do efeito antitumoral e do mecanismo de ação em linhagens de glioblastoma.....	57
5.2.1 O LQB-223 modifica a morfologia celular das linhagens de GB.....	60

5.2.2 O composto LQB-223 reduz a viabilidade celular das linhagens de GB.....	62
5.2.3 O composto LQB-223 diminui a formação de colônias das linhagens de GB	64
5.2.4 O novo composto LQB-223 altera o perfil do ciclo celular nas linhagens de GB	64
5.2.5 O composto LQB-223 induz morte celular por apoptose nas linhagens de GB	68
5.2.6 O composto LQB-223 aumenta a fosforilação da histona H2AX na linhagem T98G	70
5.2.7 O composto LQB-223 modula a via das MAP kinases ERK1/ERK2 em linhagens de GB	71
5.2.8 O composto LQB-223 altera o perfil de expressão do microRNA-7.....	73
6. Discussão.....	76
7. Conclusões.....	87
8. Referências Bibliográficas.....	88

1) INTRODUÇÃO

1.1) Gliomas

Os gliomas são tumores originados de células gliais ou progenitoras gliais. A sua ocorrência fora do cérebro é rara, e as regiões de crescimento mais incidentes, em 60,8% dos casos, são os lóbulos frontal, temporal, parietal e occipital. Os gliomas representam 27% de todos os tumores malignos e não malignos, e 80% dos tumores malignos, primários do cérebro e do sistema nervoso central (SNC). Possuem uma taxa de incidência anual, ajustada pela idade, de aproximadamente 6,3 novos casos em uma população de 100.000 habitantes e mais que 20.000 novos casos são diagnosticados a cada ano. Os dados apresentados são referentes à população dos Estados Unidos (EUA) entre os anos de 2008 e 2012 (OSTROM *et al.*, 2015). Para o Brasil, os dados epidemiológicos dos gliomas são escassos, e somente encontramos dados referentes aos tumores do SNC. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima, para o ano de 2016, 5.440 novos casos de câncer do SNC em homens e 4.830 em mulheres, valores correspondentes a um risco estimado de 5,50 novos casos a cada 100.000 homens e 4,68 para cada 100.000 mulheres.

Apesar dos tumores do SNC apresentarem uma baixa taxa de incidência, alguns subtipos exibem alta mortalidade e morbidade. A taxa de sobrevivência relativa dos pacientes com tumores do SNC em 5 e 10 anos é de 34,4% e 28,8%, respectivamente. Nos subtipos malignos são encontradas as taxas mais baixas (OSTROM *et al.*, 2015). Considerando que os tumores do SNC, inclusive os gliomas, apresentam uma evolução clínica bastante agressiva, é necessário um melhor entendimento de sua etiologia e dos fatores de risco.

1.1.1) Etiologia e fatores de risco

O estudo dos fatores de risco atuantes na carcinogênese e na progressão das neoplasias fornece um melhor entendimento da etiologia e proporciona a melhoria das ações para o seu controle por trazer novas estratégias para a prevenção, detecção precoce e tratamentos. Apesar da grande quantidade de trabalhos publicados sobre esse assunto a maioria dos casos de gliomas permanece sem uma

explicação para o seu surgimento, os poucos fatores de risco atualmente estabelecidos são divididos em fatores genéticos (causas endógenas) e não genéticos (causas ambientais/exógenas). (OSTROM *et al.*, 2014; WALSH *et al.*, 2016).

Há muito tempo têm se observado uma predisposição genética herdável para o surgimento dos gliomas. Tal fato baseia-se no aparecimento dessa neoplasia síndromes de câncer familiar e o aumento do risco de gliomas em uma mesma família (WALSH *et al.*, 2016).

Dentre as mais frequentes síndromes de câncer hereditário responsáveis pela formação dos gliomas, estão a Li-Fraumeni, neurofibromatose tipo 1 e tipo 2, esclerose tuberosa, Lynch e melanoma-astrocitoma. Cada uma dessas síndromes possui uma mutação em um ou mais genes específicos que determina o início das neoplasias (GOODENBERGER e JENKINS, 2012 ; WALSH *et al.*, 2016). Entretanto, a contribuição destes genes para o risco global dos gliomas é baixo, pelo fato de uma parcela ínfima, aproximadamente 5%, dos gliomas derivarem dessas síndromes (MALMER *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos demonstram evidências do registro de gliomas em integrantes de uma mesma família, um deles estudou uma coorte de pacientes com astrocitoma da região norte da Suécia e investigou a ocorrência de astrocitoma familiar entre os parentes de primeiro grau e em 4,7% das famílias houve relato da doença (MALMER *et al.*, 1999). Em outro trabalho foi observado que os parentes de primeiro grau de um paciente com glioma possuem um risco aumentado de duas vezes para o aparecimento da mesma neoplasia (MALMER *et al.*, 2007). Em vista disso, um consórcio intitulado GLIOGENE identifica as famílias, não afetadas pelas síndromes, com susceptibilidade para o desenvolvimento de gliomas a fim de detectar novas regiões genômicas ou locus importantes para a carcinogênese desta doença (MALMER *et al.*, 2007). Estudos de genotipagem identificaram 10 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, do inglês *single-nucleotide polymorphism*) localizados em oito regiões gênicas que conferem aumento do risco para o desenvolvimento do glioma, a *telomerase RNA component* (TERC), *telomerase reverse transcriptase* (TERT), receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), *coiled-coil domain containing 26* (CCDC26), *cyclin-dependent kinase inhibitor 2B* (CDKN2B), *pleckstrin homology-like domain* (PHLDB1), gene da proteína tumoral p53 (TP53) e *regulator of telomere elongation helicase 1* (RTEL1) (SHETE *et al.*, 2009 ; WRENSCH *et al.*, 2009 ; SANSON *et al.*, 2011; STACEY *et al.*, 2011 ;

WALSH *et al.*, 2014). Os locus de risco para o glioma, próximos ou dentro dos genes TERC, TERT e RTEL1, responsáveis pela manutenção do comprimento do telômero, ainda não haviam sido relacionados com a neoplasia, entretanto a TP53, CDKN2B e EGFR são de conhecida relação com o glioma (WALSH *et al.*, 2016).

Os fatores de risco não-genéticos descritos até o momento de acordo com o seu risco relativo são apresentados na Tabela 1.1. Os fatores de maior risco e mais consistentes são a exposição a altas doses de radiação e indivíduos com idade avançada, seguido pelos pacientes do gênero masculino e os de etnia branca. Foi observado uma diminuição do risco dos gliomas em pessoas que relataram condições alérgicas incluindo a asma (CAHOON *et al.*, 2014), elevadas taxas de IgE (SCHWARTZBAUM *et al.*, 2012), exposição ao vírus Varicela-Zoster e a presença de IgG anti vírus Varicela-Zoster (WRENSCH *et al.*, 2005).

A primeira evidência conclusiva que associou a radiação ionizante com o aparecimento de tumores cerebrais surgiu de um estudo que acompanhou crianças com dermatofitoses tratadas com terapia de radiação, no qual se verificou um aumento do risco relativo de 2,6 vezes para o surgimento de gliomas (RON *et al.*, 1988). Relatos de associações de risco com a radiação ionizante resultam de estudos em coortes expostas a radiação em procedimentos médicos terapêuticos e de diagnóstico, exposição profissional, em testes atmosféricos de armas nucleares e em regiões afetadas por bombas atômicas.

Em relação ao perfil do indivíduo com maior risco de desenvolver gliomas, temos os do gênero masculino com um risco aumentado de 1,3 vezes e os de etnia branca com um risco de 1,9 vezes quando comparados com os de etnia afro-americana. Indivíduos de idade mais avançada também possuem um risco mais elevado, principalmente para os subtipos malignos. (OSTROM *et al.*, 2015).

Pesquisadores atuantes nessa área realizam os cálculos para as associações de risco de determinado fator levando em consideração todos os gliomas e/ou seus subtipos específicos, sendo importante o diagnóstico e classificação corretos.

Tabela 1.1 Fatores de riscos não-genéticos para os gliomas.

Exposição	Associação
Fatores de risco estabelecidos	
Altas doses de radiação	+++
Gênero masculino x feminino	+
Etnia branca x afro-americanos	+
Avanço da idade	+++
Fatores de risco prováveis	
Alergias/asma	-
Elevado IgE	-
Vírus Varicela-Zoster	-
IgG anti Varicela-Zoster	-

+++ Fator de risco consistente, risco relativo >3; + Fator de risco >1; - Fator de risco <1

Adaptado de WALSH *et al.*, 2016

1.1.2) Diagnóstico

O processo de diagnóstico correto se inicia com a triagem dos indivíduos suspeitos de apresentarem uma lesão intracraniana e cuja história clínica engloba dores de cabeça frequentes, confusão mental, perda de memória, mudanças na personalidade e/ou alterações neurológicas. Posteriormente, exames complementares são empregados para confirmar a presença das lesões (WELLER, 2011). A ressonância magnética do crânio ou outros exames de neuroimagem são indicados a fim de excluir ou detectar uma neoplasia intracraniana. Exames de neuroimagem fornecem informações relevantes sobre o tumor, tais como a localização, extensão, efeito de massa, e potencial quebra da barreira hematoencefálica (BHE). Esses exames são, portanto, importantes aliados na resposta ao tratamento e no desenho terapêutico por permitir delimitar a extensão da cirurgia e/ou da radioterapia (WHITFIELD *et al.*, 2014). Um diagnóstico realizado somente por exames de neuroimagem não é adequado, pois resultados falso-positivos são comuns. Por essa razão torna-se imprescindível, em todos os pacientes após a biópsia, que o exame histopatológico seja efetuado por uma equipe qualificada de patologistas (WELLER, 2011).

Um grande progresso tem sido observado no diagnóstico e prognóstico dos gliomas com o advento das tecnologias de expressão gênica de larga escala como o sequenciamento de nova geração (NGS). Este permite identificar marcadores moleculares de significância clínica e indicadores de prognóstico favorável, alguns desses de maior importância como a codeleção cromossômica 1p/19q, a metilação do promotor do gene O6-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) e a mutação no gene isocitrato desidrogenase humana 1 (IDH1) (TABATABAI *et al.*, 2010 ; SIEGAL, 2016). Um trabalho recente visando auxiliar o diagnóstico molecular dos gliomas relatou a validação da técnica de NGS para um painel de 20 genes frequentemente alterados, e de acordo com as alterações observadas foi proposto uma nova classificação dos gliomas em grupos biológicos distintos (ZACHER *et al.*, 2016). Neuro-epidemiologistas publicaram um guia de sugestões de como proceder para incorporar o diagnóstico molecular na classificação atualmente vigente (LOUIS *et al.*, 2014).

1.1.3) Classificação

Os gliomas são classificados em códigos de acordo com a Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O) e em graus de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). (LOUIS, *et al.*, 2007).

A CID-O permitiu padronizar por códigos a classificação dos tumores de acordo com a sua característica morfológica facilitando, dessa forma, o acesso aos dados por epidemiologistas. Levando-se em consideração a célula glial presente na neoplasia, podem ser denominados como: tumores astrocíticos (derivado dos astrócitos), oligodendrogliais (derivado dos oligodendrócitos), ependimais (derivado das células ependimárias) e gliomas mistos (por exemplo, os tumores oligoastrocíticos). (LOUIS, *et al.*, 2007).

Para complementar a classificação dos gliomas a OMS classifica-os de acordo com seu grau histológico ou escala de malignidade, o que permite prever o comportamento biológico de uma neoplasia e facilita a escolha sobre a terapia a ser empregada. Os tumores astrocíticos são divididos em quatro graus (I, II, III e IV), os oligodendrogliais e os oligoastrocíticos em dois graus (II e III) e os ependimais em três graus (I, II e III). O grau I aplica-se as lesões com baixo potencial proliferativo e apresenta possibilidade de cura após a ressecção cirúrgica. O grau II exibe natureza

infiltrativa com atipia citológica e baixa atividade proliferativa. O grau III inclui atipia nuclear, alta atividade mitótica e anaplasia. Os graus II e III podem recorrer e progredir para graus mais elevados de malignidade. Por fim, os tumores grau IV, além das características anteriormente citadas, apresentam proliferação microvascular e/ou necrose e em algumas neoplasias infiltração generalizada de tecido e uma disseminação cranioespinhal, o que permite uma rápida evolução antes e após o tratamento culminando em um desfecho clínico fatal. Os tumores astrocíticos, portanto, se dividem em: tumores de baixo grau, o astrocitoma pilocítico (tumor benigno de grau I) e o astrocitoma difuso (grau II) e os tumores malignos e infiltrativos de alto grau, como o astrocitoma anaplásico (grau III) e o glioblastoma (grau IV) (LOUIS, *et al.*, 2007).

1.1.4) Glioblastoma (GB)

O GB é um tumor astrocítico e de acordo com a OMS é classificado com os códigos CID 9440/3, 9441/3 e 9442/3 e possui escala de malignidade Grau IV (LOUIS, *et al.*, 2007). Dados recentes de um estudo epidemiológico realizado na população dos EUA entre os anos de 2008 e 2012 descreve que o GB é o terceiro mais frequente, representando 15,1%, entre todos os tumores primários do cérebro e do SNC. GB é o subtipo mais comum dentre todos os tumores malignos do cérebro e do SNC, e entre os gliomas, com taxas de 46,1% e 55,1%, respectivamente. Por ano 10.787 novos casos são diagnosticados e a taxa de incidência anual, ajustada pela idade, é de 3,2 novos casos a cada 100.000 habitantes.

O GB é mais incidente em homens do que em mulheres e em pessoas de etnia branca quando comparadas aos afro-americanos, com um risco aumentado de 1,6 vezes e 2 vezes, respectivamente. A sua incidência aumenta com a idade sendo as maiores taxas registradas no grupo de pacientes entre 75 e 84 anos e a idade média de diagnóstico em 64 anos. A população acima de 40 anos apresenta uma taxa de incidência anual de 6,96 novos casos a cada 100.000 habitantes (OSTROM, *et al.*, 2015).

Após o diagnóstico os pacientes com GB apresentam uma taxa de sobrevivência relativa de 15,2% em 2 anos e de 5,1% em 5 anos (OSTROM, *et al.*, 2015). Uma pequena melhora na sobrevivência dos pacientes com GB tem ocorrido ao longo dos

anos, no entanto a sobrevida média dos pacientes adultos é de 9,7 meses (Dados referentes para a população dos EUA no período entre 2005 e 2008, JOHNSON e O'NEILL, 2012). O GB é um tumor que resulta em baixa sobrevida e o seu tratamento é ineficaz. Por essa razão, as pesquisas atuais estão concentradas na identificação detalhada das alterações genéticas responsáveis por sua iniciação e evolução. As alterações reveladas poderão auxiliar na melhoria do diagnóstico, prognóstico e tratamento.

1.1.4.1) Alterações genéticas

Como citado anteriormente, uma pequena parte dos pacientes com glioma, aproximadamente 5%, têm sua carcinogênese ligada às síndromes hereditárias. Portanto, a maioria dos pacientes se constitui como casos esporádicos, no qual a transformação maligna é resultante do acúmulo de alterações genéticas e regulação diferencial de suas vias de sinalização (ALIFIERIS e TRAFALIS, 2015).

Um estudo (realizado na Suíça) em pacientes diagnosticados com GB (entre os anos de 1980 e 1994) determinou a frequência das principais alterações genéticas relatadas anteriormente na literatura e seu efeito na sobrevida dos pacientes. Das alterações genéticas identificadas no GB, a perda de heterozigosidade (LOH) 10q, em 69% dos pacientes foi a mais frequente; seguida por amplificação do receptor do EGFR, em 34%; mutação em TP53, em 31%; deleção em homozigose de p16^{INK4a}, em 31%; e mutação na fosfatase homóloga a tensina (PTEN), em 24%. A presença de LOH 10q foi preditiva de uma sobrevida curta. (OHGAKI, *et al.*, 2004).

PARSONS e colaboradores (2008) sequenciaram 20.661 genes codificadores de proteínas em amostras de tumores de GB humano e identificaram, na maioria delas, alterações em genes que codificam para os membros de vias de sinalização específicas. As vias alteradas foram a do gene TP53, do retinoblastoma (RB1) e fosfatidilinositol 3-quinase (PTEN). O grupo detectou uma mutação que ainda não havia sido descrita no gene IDH1 em 12% dos pacientes. O gene do IDH1 codifica uma enzima que cataliza a reação de carboxilação oxidativa do isocitrato em alfa-cetoglutarato, a mutação caracterizada leva a perda de função da proteína pela mudança de um aminoácido em sua região catalítica. Neste estudo, foi observada

uma melhora na sobrevida global dos pacientes que possuíam mutação no gene do IDH1.

O projeto Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) tem como objetivo descobrir e cadastrar as alterações do genoma de grupos de pacientes com tumores, utilizando protocolos de expressão gênica de larga escala, a fim de entender a carcinogênese da neoplasia analisada, sendo o GB o primeiro tumor investigado. A partir das alterações encontradas em genes previamente reportados, foi realizado um mapeamento, em vias de sinalização comuns, e outras recém-identificadas, principalmente quanto a mutação, deleção em homozigose e amplificação. Foi possível definir três vias de sinalização altamente desreguladas: a via do RB, do TP53 e dos Receptores Tirosina Quinase/RAS/PI3K (RTK/RAS/PI3K), com porcentagens de alterações em pelo menos um dos genes integrantes da via de 87%, 78% e 88%, respectivamente. Em 74% das amostras as alterações estavam inclusas nas três vias, sugerindo que a desregulação observada são centrais para o processo de carcinogênese do GB. (Cancer Genome Atlas Research Network., 2008).

Os dados gerados pelo projeto do TCGA são de grande relevância para entendimento da progressão do GB e inicia um novo caminho para as pesquisas nessa área. VERHAAK e colaboradores (2010) utilizaram esses dados como base para propor uma classificação molecular do GB, reforçando a classificação clínica atualmente vigente.

1.1.4.2) Classificação clínica

O GB pode ser diferenciado quanto ao seu histórico clínico em dois subtipos diferentes, os primários e os secundários. O tumor diagnosticado após um curto período do aparecimento dos primeiros sintomas, e sem nenhuma evidência clínica de lesões precursoras de menor grau são denominados primários ou *de novo*. Os pacientes que apresentam evidência radiológica e histopatológica de gliomas de menor grau, geralmente os astrocitomas difusos e os anaplásicos (Grau II e III), são conhecidos como secundários (ONGAKI e KLEIHUES, 2013).

Quando se compara os pacientes com GB primário e secundário é possível observar algumas diferenças epidemiológicas. O GB primário acomete pacientes com média de idade de 62 anos, enquanto os secundários os pacientes mais jovens,

com média de 45 anos. Houve diferença na sobrevida média após o diagnóstico dos pacientes com GB primário e secundário, de 4,7 e 7,8 meses, respectivamente. O GB secundário possui um menor grau de necrose e é de localização preferencial no lobo frontal. Os primários são os mais frequentes, representando aproximadamente 95% de todos os GBs (ONGAKI e KLEIHUES, 2005). Histologicamente, os GBs primários e secundários são idênticos, apresentando diferenças quanto ao seu perfil genético e epigenético.

Um dos contrastes mais relevantes é a presença da mutação no gene IDH1. No primeiro relato do aparecimento de mutações no gene IDH1 em pacientes com GB, foi observado que esse evento ocorreu, em maior número, nos indivíduos mais jovens e em sua maioria diagnosticados com GB secundário (PARSONS, *et al.*, 2008). Posteriormente, um grande número de trabalhos foi publicado a fim de relacionar este gene como potencial marcador molecular de diagnóstico. BALSS e colaboradores (2008) demonstraram que a mutação no gene IDH1 acomete 88% de todos os pacientes com GB secundário, além de possuir uma alta frequência em oligodendroglioma e astrocitoma difuso e anaplásico. Em conformidade, um estudo publicado por NOBUSAWA e colaboradores (2009) confirmou que a presença da mutação no gene IDH1 é um marcador molecular de diagnóstico de GB secundário mais seletivo e objetivo que o critério clínico, além dessa mutação estar associada a uma melhor resposta ao tratamento. Quando comparamos os dados de incidência do GB secundário, na população doente total, gerados entre o diagnóstico clínico pela presença da mutação em IDH1 ou pelo histórico de lesões precursoras não se encontra diferença significativa, subindo ligeiramente da faixa de 5% para 9% (NOBUSAWA, *et al.*, 2009).

Antes da descoberta de que as mutações em IDH1 poderiam ser utilizadas para auxiliar o diagnóstico clínico, acreditava-se que tanto o GB primário quanto o secundário eram originados da mesma população de células precursoras, diferindo somente quanto ao comportamento clínico e biológico devido à aquisição de alterações genéticas diferentes (OHGAKI e KLEIHUES, 2007). Entre elas, destacamos a LOH 10q como a alteração genética presente tanto nos GBs primários quanto os secundários. Amplificação de EGFR, deleção de p16^{INK4a} e mutações em PTEN são características genéticas mais frequentes em GB primários, enquanto as mutações em TP53 (OHGAKI e KLEIHUES, 2007) e IDH1 (BALSS, *et al.*, 2008) são mais frequentes em GB secundário (Figura 1.1). Atualmente, evidências crescentes apontam que, apesar de suas características histológicas semelhantes, esses

tumores se originam de células precursoras diferentes. Dentre essas evidências destaca-se que os gliomas oligodendrogliais também possuem mutação em IDH1. GB primário e secundário se desenvolvem em pacientes de grupos de idade e sexo diferentes, não se localizam na mesma região do cérebro e diferem com relação à história clínica (ONGAKI e KLEIHUES, 2013).

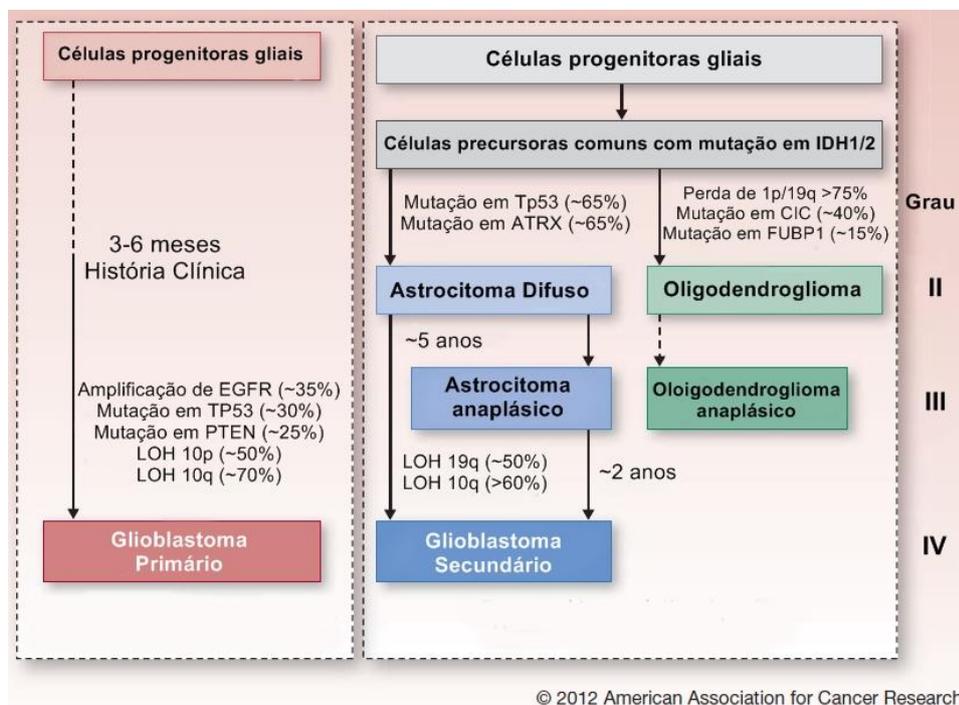


Figura 1.1. Origem dos glioblastomas (GBs) primários e secundários e suas principais diferenças quanto ao perfil genético. A figura mostra as alterações genéticas mais frequentes evidenciando a diferença entre a carcinogênese dos GBs primários e secundários. Adaptado de OHGAKI e KLEIHUES, 2013.

1.1.4.3) Classificação molecular

A classificação molecular foi proposta e fundamentada no fato de que a classificação anterior, definida pelos aspectos clínicos, não distingue os grupos de pacientes quanto ao seu perfil genético conhecidamente diferente. Essa nova classificação foi baseada, principalmente, nas alterações genéticas e perfis de expressão diferenciais descritos pelo atlas TCGA, nos genes do Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas tipo Alfa (PDGFRA), do EGFR, da Neurofibromina 1 (NF1) e do IDH1. Foi também levado em consideração o perfil de

expressão de genes de assinatura, identificando o estágio da neurogênese em que a célula se encontra (VERHAAK, *et al.*, 2010). Um estudo anterior classificou os glioblastomas em duas subclasses, proneural e mesenquimal, que divergiram quanto aos seus marcadores e prognóstico (PHILLIPS, *et al.*, 2006). Portanto, a denominação proposta para os subgrupos atuais levou em consideração, além dos genes de assinatura identificados, a classificação do estudo anterior. Desta forma os GBs foram subdivididos em clássico, mesenquimal, proneural e neural, e são explicados a seguir de forma resumida.

O subtipo clássico é definido por uma elevada taxa de amplificação do gene do EGFR, encontrado em 97% das amostras e com níveis aumentados em quatro vezes em relação aos outros subtipos. Outros fatores levados em consideração para essa definição foi a presença de mutação pontual no gene do EGFR e a variante III do gene de EGFR (EGFRvIII), assim como a deleção de alguns integrantes da via do RB. Marcadores de células troncos e precursores neurais são característicos desse subtipo. (VERHAAK, *et al.*, 2010).

O subtipo mesenquimal é caracterizado por níveis de expressão gênica diminuídos e mutações em NF1 (Neurofibromatose tipo 1), totalizando uma alteração nesse gene em 53% das amostras. Mutações no gene da PTEN também foram encontradas (VERHAAK, *et al.*, 2010). Um perfil de expressão de marcadores mesenquimais anteriormente descrito predominou nesse subtipo (PHILLIPS, *et al.*, 2006).

As duas principais características do subtipo proneural foram as alterações em PDGFRA e mutações em IDH1. O PDGFRA é encontrado amplificado e em conjunto com os altos níveis de expressão do seu gene. A maioria das alterações em TP53 do estudo foi descrita para esse subtipo, como a perda de heterozigose e mutações pontuais. Houve uma alta expressão de genes de desenvolvimento oligodendrocíticos (VERHAAK, *et al.*, 2010), além da expressão de genes de desenvolvimento proneural (PHILLIPS, *et al.*, 2006).

O subtipo neural foi distinguido pela expressão de marcadores neuronais. Apesar do diagnóstico do subtipo neural ter sido confirmado como GB, as amostras de tecidos normais do cérebro utilizadas no estudo também foram classificadas como subtipo neural (VERHAAK, *et al.*, 2010).

Quanto às correlações das características clínicas para os subtipos moleculares, a maioria dos GBs secundários foi classificado como proneurais e

estes acometeram pacientes mais jovens. Houve uma tendência a maior sobrevida para pacientes do subtipo proneural (VERHAAK, *et al.*, 2010).

A definição em subgrupos moleculares distintos faz com que os pacientes que exibem alterações nas mesmas vias de sinalização sejam classificados em conjunto e conseqüentemente sejam susceptíveis a mesma classe de agentes terapêuticos. Tal aspecto tem o potencial de facilitar o desenho de estudos de protocolos clínicos para terapias alvo moleculares.

1.1.4.4) Tratamento

A escolha do melhor protocolo de tratamento depende de alguns fatores, como o momento do diagnóstico, se o tumor foi recentemente diagnosticado ou é recidiva, e a idade dos pacientes. Para as neoplasias recém-diagnosticadas o protocolo padrão se baseia em um tratamento multimodal. Inicialmente o paciente é submetido a ressecção cirúrgica e posteriormente a radioterapia fracionada e quimioterapia com temozolamida (TMZ) (Figura 1.2). Este tratamento, da forma como foi descrito, é fruto de um estudo multicêntrico de fase III publicado em 2005 (STUPP, *et al.*, 2005).

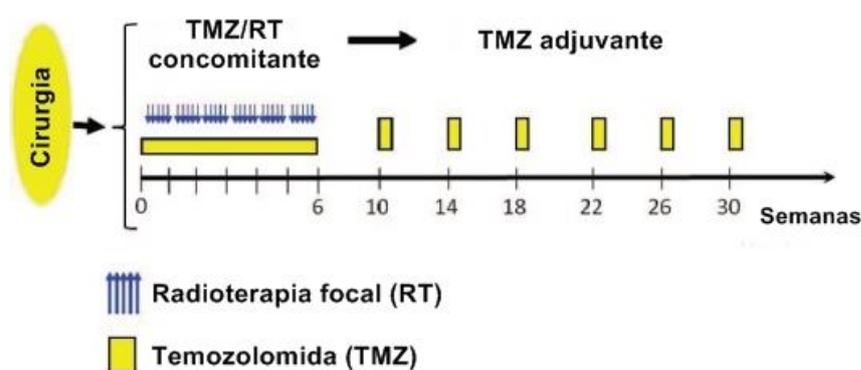


Figura 1.2 Tratamento padrão administrado para os pacientes recém-diagnosticados com glioblastoma (GB). O procolo se baseia em um tratamento multimodal, no qual inicialmente o paciente é submetido a ressecção cirúrgica e posteriormente a radioterapia fracionada e quimioterapia com temozolamida (TMZ). Adaptado de HOLDHOFF e GROSSMAN, 2011.

A ressecção cirúrgica geralmente é a primeira abordagem terapêutica realizada no paciente com GB após o diagnóstico. A maior área de extensão do procedimento operatório é relacionada ao aumento de sobrevida, buscando sempre preservar a função neurológica do paciente (MCGIRT, *et al.*, 2009). Sugere-se que esse aumento seja devido à redução do volume tumoral, o que facilitaria a ação da quimioterapia e da radioterapia (KELES, *et al.*, 2004). Infelizmente a cirurgia não é capaz de promover a cura dos pacientes com GB devido ao grande potencial infiltrativo das células tumorais.

Após a cirurgia, o protocolo de radioterapia é iniciado. O avanço das técnicas de radiação permite que esta abordagem seja realizada no foco do tumor, minimizando os efeitos colaterais da radiação no tecido cerebral normal. Geralmente se aplica uma dose total de 60Gy em frações diárias de 2Gy, 5 vezes na semana durante 6 semanas. A radioterapia é aplicada na área do tumor em conjunto com a margem do tecido aparentemente normal, buscando a inclusão de potenciais células tumorais infiltradas (OMAY e VOGELBAUM, 2009).

O quimioterápico TMZ foi aprovado para o tratamento de gliomas malignos em 1999 e incorporado ao tratamento com cirurgia e radioterapia após um estudo clínico multicêntrico realizado por STUPP e colaboradores (2005). Esses autores demonstraram que quando o quimioterápico foi administrado houve um ganho de sobrevida de 2,5 meses. A TMZ é um derivado da imidazotetrazina, absorvido por via oral e com potencial para atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE). Apresenta atividade farmacológica quando hidrolisada *in vivo* para 5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC), o qual age como um agente alquilante, transferindo radicais metil para a posição O⁶ da guanina (NAJMAN e GADELHA, 2002). O tratamento com a TMZ se inicia com uma dosagem de 75 mg/m² diariamente, ao longo de seis semanas, e de forma concomitante com a radioterapia. Em seguida, e de forma adjuvante, em doses de 150 mg/m² por cinco dias para o primeiro ciclo e se bem tolerada aumentada para 200 mg/m² por cinco dias em intervalos de 28 dias entre os 5 ciclos restantes. Em alguns casos, o tratamento com a TMZ pode ser estendido por mais de um ano.

O potencial de efetividade do novo protocolo para o tratamento do GB foi investigado em um estudo que comparou a sobrevida dos pacientes diagnosticados nos EUA, entre os períodos de 2000 a 2003 (pré-TMZ) e 2005 a 2008 (pós-TMZ). A média de sobrevida global de todos os pacientes do período pré-TMZ foi de 8,1 meses enquanto no período pós-TMZ de 9,7 meses. Quando somente os pacientes

tratados com cirurgia e radioterapia foram analisados, a média de sobrevida foi de 12 meses, e de 14,2 meses nos períodos pré e pós-TMZ, respectivamente. O aumento de sobrevida no período após a inserção da TMZ reforça a importância dessa molécula para o tratamento do GB. Sabe-se que a radiação ionizante possui um grande benefício, pois quando analisamos os pacientes que não receberam esse tratamento a média de sobrevida é de apenas 3 meses. (JOHNSON e O'NEILL, 2012).

A literatura diverge quanto a real eficácia do tratamento com a TMZ. Alguns autores questionam o seu uso levando em consideração o alto valor do quimioterápico e o seu real benefício para o tratamento (LINZ, 2008). Um trabalho recente demonstrou que a TMZ não aumenta a sobrevida quando combinada com a ressecção cirúrgica e a radioterapia em pacientes com idade acima de 60 anos (CAO, *et al.*, 2012).

Outros protocolos quimioterápicos foram implementados e/ou sugeridos, antes mesmo do advento da TMZ, para o tratamento do GB e podem ser utilizados de acordo com a escolha da equipe médica. Entre os agentes ativos estão inclusos as nitrosuréias: lomustina (CCNU) e carmustina (BCNU), compostos de platina, irinotecano e combinação PCV (Procarbazona, CCNU e Vincristina). No entanto, um pequeno aumento de sobrevida é relatado com o uso desses protocolos de quimioterapia e inclusive das nitrosuréias que costumam ser o segundo protocolo mais utilizado (STEWART, 2002).

Independente da terapia padrão adotada para os pacientes recém-diagnosticados a recorrência da doença é inevitável, e ocorre em cerca de 6,9 meses (STUPP *et al.*, 2005). Para esses pacientes não existe um protocolo de tratamento estabelecido. A terapia pode incluir uma nova cirurgia, radioterapia, quimioterapia e participação em ensaios clínicos (WEN, 2009). Uma nova cirurgia é associada com alta morbidade e mortalidade, no entanto pode ser uma opção para alguns pacientes com características clínicas e histopatológicas específicas. A re-irradiação é efetiva em alguns casos, mas devido aos seus efeitos colaterais a escolha desse tratamento, na maioria das vezes, não é adotada pelos oncologistas (NIYAZI, *et al.*, 2011). Novos protocolos como a radiocirurgia têm apresentado melhora na sobrevida (PATEL, *et al.*, 2009). A quimioterapia baseada em altas doses de TMZ, a monoterapia com nitrosuréias e o protocolo PCV podem ser utilizados, porém as abordagens possuem baixa eficácia e uma alta toxicidade hematológica (HAPPOLD, *et al.*, 2009 ; SCHMIDT, *et al.*, 2006).

Os estudos das alterações genéticas ampliaram o nosso conhecimento sobre as vias de sinalização responsáveis pela malignidade do GB e abriu o caminho para as terapias alvo-específica. Diversos ensaios clínicos têm sido realizados e em sua maioria em pacientes recorrentes visando, principalmente, a inibição de RTKs e suas vias. Esse destaque ressalta a importância dessa via de sinalização para a carcinogênese do GB. Inicialmente, o enfoque dos ensaios clínicos foi direcionado para a monoterapia com o intuito de aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade, no entanto nenhum benefício foi observado. Com o intuito de reverter a resistência observada com a monoterapia, busca-se a inibição de múltiplas vias de sinalização. Portanto, atualmente, os ensaios clínicos avaliam a eficácia da combinação de diferentes monoterapias e o uso de inibidores múltiplos de tirosina quinases. (SATHORNSUMETEE, *et al.*, 2007). As classes mais comuns de moléculas para o tratamento alvo-específico de GB são os anticorpos monoclonais e os inibidores de tirosina quinase (TKI), como o cetuximab, um anticorpo monoclonal para o EGFR (Ensaio clínico de fase II, KREISL, *et al.*, 2009) e o gefitinibe, um TKI do EGFR (Ensaio clínico de fase II, RICH, *et al.*, 2004).

Apesar dos diferentes protocolos de resgate existentes e o estudo da eficácia de terapias alvo-específica em ensaios clínicos, os pacientes evoluem invariavelmente para o óbito. Essa rápida evolução se deve, em parte, à resistência ao tratamento. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos envolvidos nesse processo é de extrema importância. Além do estudo de novos compostos antitumorais com uma grande cobertura de modulação das vias de sinalização relevantes para o glioblastoma.

1.1.4.5) Resistência ao tratamento

A refratariedade ao tratamento do câncer é um dos maiores desafios clínicos enfrentados no controle dessa doença. A grande maioria das neoplasias desenvolve resistência ao tratamento em algum momento do curso da doença e não possuem cura. A resistência pode ser compreendida de duas formas, a adquirida e a intrínseca. Na resistência adquirida o paciente apresenta uma resposta inicial ao tratamento utilizado e uma posterior ausência de resposta. Enquanto que na resistência intrínseca nenhuma resposta satisfatória é observada desde o primeiro contato com o agente terapêutico utilizado (GOLDIE, *et al.*, 2001).

O tratamento dos pacientes com GB resistentes é uma tarefa árdua, por se tratar de um tumor bastante heterôgeneo com limitado mecanismo de reparo e uma alta complexidade anatômica. Como em todos os tumores, a resistência ao tratamento no GB é definida por um conjunto de fatores, ou seja, apresenta um perfil multifatorial. Dentre os mais discutidos pela literatura estão, o efluxo de drogas, a presença de hipóxia intratumoral e de células tronco tumorais, mecanismos de reparo do dano ao DNA (Ácido desoxirribonucléico), e os microRNAs (HAAR, *et al.*, 2012). As alterações observadas na via dos RTKs, nessa neoplasia, também surgem como um dos fatores responsáveis pela resistência à terapia (SQUATRITO e HOLLAND, 2011).

Um dos mecanismos de escape da célula tumoral ao tratamento é o efluxo ativo de um grande espectro de quimioterápicos através da membrana plasmática por proteínas especializadas. Esse fenômeno, conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR), é caracterizado, principalmente, pela superexpressão de proteínas da família de transportadores ABC (ATP Binding-Cassette). Essas proteínas funcionam como bombas de efluxo dependentes de ATP (adenosina trifosfato), reduzindo a concentração dos quimioterápicos a níveis subletais no interior da célula. As moléculas mais estudadas dessa família compreendem a glicoproteína P (Pgp), a proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (MRP) e a proteína de resistência em câncer de mama (BCRP). Um estudo em GB observou altas taxas da proteína MRP em linhagens celulares e amostras tumorais quando comparadas ao tecido normal (MOHRI, *et al.*, 2000). Nosso grupo possui experiência no estudo da MDR em linfomas, leucemias, câncer de mama e com o GB. Em 2008, DE FARIA e colaboradores avaliaram a expressão das proteínas Pgp e MRP1 em pacientes do INCA, diagnosticados com gliomas de baixo ou alto grau. Foi demonstrado que a proteína MRP1 estava presente com maior frequência nos gliomas de alto grau, sobretudo no GB, enquanto a proteína Pgp nos gliomas de baixo grau. Para um quimioterápico efetuar seu mecanismo de ação nos gliomas, é necessário que a molécula tenha a capacidade de atravessar a BHE. As bombas de efluxo P-gp e Bcrp1 são umas das responsáveis por reduzir a penetração de quimioterápicos através da BHE. E por essa razão, alguns trabalhos em GB reforçam o papel dessas bombas de efluxo como um dos fatores de quimiorresistência (DE VRIES, *et al.*, 2012).

As terapias utilizadas no tratamento dos gliomas, como os agentes alquilantes e a radiação ionizante, induzem danos ao DNA da célula o que ativa uma cascata de

sinalização específica. De forma sucinta, o mecanismo se inicia pela ativação de proteínas sensíveis ao dano, como ATM (Ataxia telangiectasia mutada) e ATR (Ataxia telangiectasia relacionada a Rad3), que por sua vez fosforilam as quinases efetoras Chk1 (Checkpoint kinase 1) e Chk2 (Checkpoint kinase 2), resultando em parada no ciclo celular para um possível reparo e/ou apoptose. A proteína supressora tumoral p53, ativada por fosforilação pelas quinases efetoras, é uma das responsáveis pelas alterações observadas nas células após o dano ao DNA. Quando ocorre a quebra da dupla fita do DNA, geralmente induzida pela radiação ionizante, a histona H2AX é fosforilada (γ -H2AX) no sítio da lesão, gerando focos dessa proteína no DNA. Dessa forma, os focos de γ -H2AX são considerados um marcador molecular para a quebra da dupla fita do DNA. Os genes que codificam os componentes da via de resposta ao dano do DNA estão frequentemente alterados nos gliomas, e a perda dos participantes da cascata de sinalização, ATM/Chk2/p53, aceleram o desenvolvimento tumoral em modelos de glioma em camundongos (SQUATRITO, *et al.*, 2010). Quanto ao seu papel na resistência à terapia, foi observado que a perda do gene de Chk2 protege as células de glioma da apoptose induzida pela radiação ionizante *in vivo*, contribuindo dessa forma para a radorresistência (SQUATRITO, *et al.*, 2010). Uma parcela considerável dos pacientes com GB, aproximadamente 31%, apresenta o gene da p53 mutado (ONGAKI, *et al.*, 2004). A presença dessa mutação em linhagens de GB induz resistência ao tratamento com a TMZ (BOCANGEL, *et al.*, 2002). Os danos ao DNA causados pelos agentes alquilantes podem ser reparados pela proteína MGMT, uma vez que sua função é retirar o radical metil inserido pelos quimioterápicos nas bases do DNA na posição O⁶. A atuação dessa proteína é o principal mecanismo de resistência aos quimioterápicos alquilantes, e principalmente a TMZ (HEGI, *et al.*, 2005). O silenciamento gênico de MGMT por metilação em seu promotor ocorre em 45% dos casos de glioblastoma, sendo um fator independente de prognóstico favorável, e de predição de maior sobrevida após o tratamento com a TMZ (HEGI, *et al.*, 2005).

O eixo de sinalização iniciado pela ativação dos RTKs, principalmente pelo EGFR, além de ser um dos fatores essenciais para a iniciação e a evolução do GB, possui um papel na resistência à terapia, por regular a maquinaria de reparo do dano ao DNA (HATANPAA, *et al.*, 2010 ; SQUATRITO e HOLLAND, 2011). Essa regulação pode ocorrer de forma direta, ou através das suas vias de sinalização, caracterizando uma forma de regulação indireta (SQUATRITO e HOLLAND, 2011).

A radiação ionizante induz a translocação para o núcleo do EGFR, e como consequência o aumento da atividade de proteínas de reparo ao dano (DITTMANN, *et al.*, 2005), um exemplo de uma regulação direta. Em relação à regulação indireta muitos trabalhos estão sendo publicados em GB. Entre eles, um que avaliou a expressão do EGFRvIII, uma das formas mutantes do EGFR, em GB induzido em camundongos. Esse estudo mostrou que esta forma mutante confere resistência à radiação pela participação da via de PI3K/AKT (Proteína kinase B) no aumento do reparo do DNA (MUKHERJEE, *et al.*, 2009). Outro grupo, demonstrou que a sinalização induzida pelo EGFR ou pelo EGFRvIII promove os dois maiores tipos de reparo da quebra da dupla fita do DNA em linhagens de GB, enquanto que a inibição das proteínas AKT (proteína kinase B) e MEK/ERK (Proteína regulada por sinais extracelulares) resulta em uma significativa diminuição de um dos mecanismos de reparo (GOLDING, *et al.*, 2009). Além disso, a elevada expressão de p-ERK, em amostras tumorais de pacientes com GB, foi associada com aumento da resistência à radiação ionizante (PELLOSKI, *et al.*, 2006). Dessa forma, a redução da ativação do EGFR ou do PDGFR, por um anticorpo monoclonal ou por um TKI, aumenta a sensibilidade a terapia com radiação ionizante, em tumores de GB induzidos em camundongos (JOHNS, *et al.*, 2010 ; GENG, *et al.*, 2006). Em relação aos outros tipos de tratamento foi observado que a inibição de MEK é capaz de sensibilizar, as células troncos de GB, à terapia com TMZ através da redução da expressão de MGMT (SATO, *et al.*, 2011). Pelas razões expostas, tem sido proposto que para se alcançar um melhor resultado terapêutico nos gliomas, a inibição da via de sinalização induzida pelo EGFR, combinado com as terapias padrões, pode ser uma abordagem promissora.

Os microRNAs modulam a expressão gênica de forma pós transcricional pela ligação, por complementaridade de base, ao mRNA alvo. Portanto, regulam diversos processos de uma célula tumoral, inclusive os relacionados a aquisição de um fenótipo de resistência a terapia, como o metabolismo de drogas, influxo/efluxo de drogas, resposta ao dano do DNA, células troncos tumorais, entre outros (GOMES, *et al.*, 2016). A expressão diferencial dessas moléculas no tumor antes do tratamento tem sido associada com a ausência de resposta a terapia contribuindo, portanto, para a resistência intrínseca ao tratamento. Em relação à resistência adquirida, tem-se observado alterações na expressão dos microRNAs após o tratamento com a radiação ionizante em muitas neoplasias (DICKEY, *et al.*, 2011), e inclusive no GB (CHAUDHRY, *et al.*, 2010 ; NIEMOELLER, *et al.*, 2011). No GB, os

microRNAs que contribuem para a aquisição de um fenótipo de resistência atuam modulando a expressão gênica de bombas de efluxo, vias de reparo ao dano e a via do EGFR (KOSHKIN, *et al.*, 2013 ; BESSE, *et al.*, 2013). A seguir, destacamos dois microRNAs envolvidos no processo de aquisição de resistência no GB, e analisados na presente dissertação.

1.2) Receptores Tirosina Quinases e a via RAS/RAF/MEK/ERK

A sinalização conduzida por fatores de crescimento e hormônios atuam por meio de receptores tirosina-quinases, levando a regulação da transcrição gênica e induzindo diversas respostas, como o crescimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, além da angiogênese, migração e apoptose. Os RTKs são proteínas transmembrana de um único segmento, um domínio extracelular de interação com o ligante e um domínio intracelular com atividade enzimática. A sua ativação ocorre quando dois ou mais receptores se reúnem na membrana, formando dímeros ou oligômeros mediante a sua aproximação por um ligante extracelular. Tal fenômeno permite um rearranjo do domínio intracelular, que possui atividade tirosina quinase e fosforila outros domínios. Os resíduos fosforilados funcionam como sítios de ancoramento para a ligação de diversas proteínas sinalizadoras, o que desencadeia a ativação de vias de sinalização específicas. Mutações nos RTKs e uma maior ativação de suas vias de sinalização estão presentes em algumas doenças, entre elas o câncer (LEMMON e SCHLESSINGER, 2010).

Dentre as diversas características que uma célula adquire durante o desenvolvimento de um tumor, na maioria delas pelo menos uma das alterações citadas acima pode estar presente. A capacidade de manter uma proliferação celular descontrolada é uma das características adquiridas. Para isso, a célula tumoral pode produzir e/ou estimular as células normais do estroma a produzir fatores de crescimento, aumentar os níveis de RTKs na membrana por amplificação gênica e/ou torná-los ativos de forma independente de ligante, através de alterações estruturais nos RTKs por mutações em seu gene. Além disso, pode ocorrer uma ativação autônoma das vias de sinalização estimuladas pelos RTKs, por amplificação das proteínas efetoras e mutações ou deleções das proteínas reguladoras negativas. (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

No contexto do GB muitos trabalhos foram publicados ao longo dos anos, reforçando a importância dos RTKs e de suas vias de sinalização na carcinogênese e evolução dessa doença. As principais vias ativadas por RTKs e que se encontram desreguladas no GB, são as vias da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) -Ras/Raf/MEK/ERK1/2 e a da fosfatidilinositol3'-quinase (PI3K)/AKT/mTOR (Proteína alvo da rapamicina em mamíferos). Como já foi dito anteriormente, 88% das amostras analisadas possuíram alterações em pelo menos um dos genes participantes da via de RTK/RAS/PI3K. Foi encontrado uma taxa de 13% de amplificação em PDGFRA, 4% de amplificação no receptor MET, 45% de mutação e/ou amplificação no EGFR, 15% de mutação em PI3K, 36% de mutação e deleção em PTEN e 18% de mutação e deleção em NF1 (Figura 1.3).

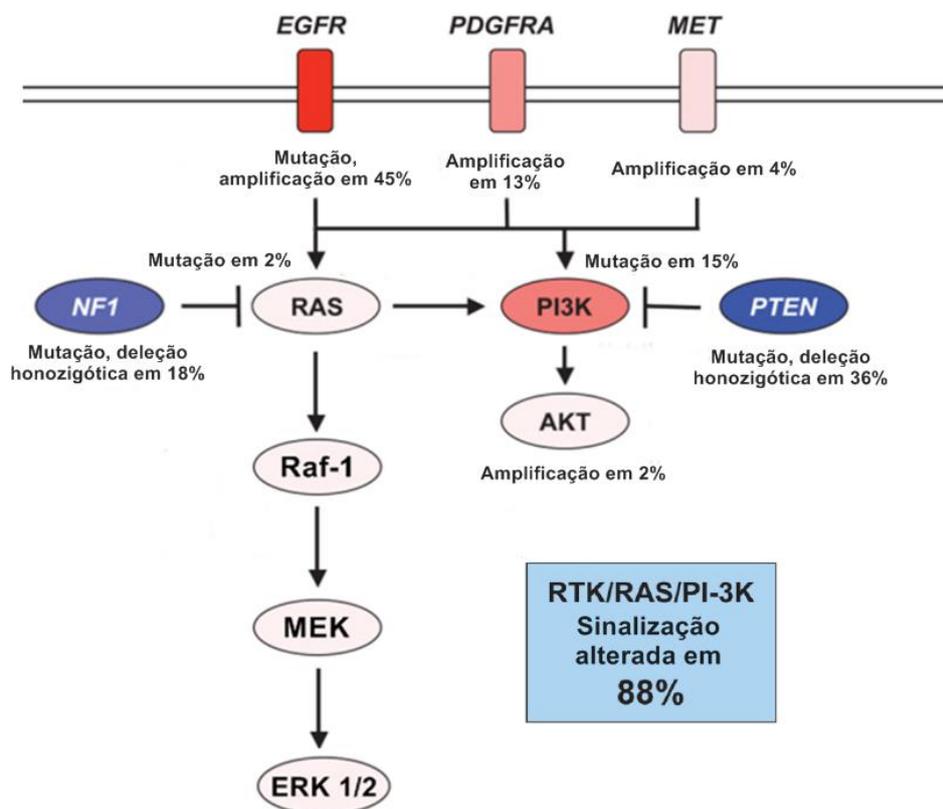


Figura 1.3 Alterações genéticas frequentes na via de sinalização RTK/RAS/PI-3K. A figura apresenta cada componente da via de acordo com a natureza de sua alteração gênica (mutação, amplificação e deleção homozigótica), bem como a porcentagem dos pacientes com GB que a alteração é encontrada. A cor vermelha indica alterações genéticas ativadoras enquanto a cor azul inativadoras. Altas porcentagens de alterações são representadas pelo escurecimento do tom de cada cor. A caixa azul representa a porcentagem das amostras analisadas que possuíram alterações em pelo menos um dos genes participantes da via de RTK/RAS/PI3K. Adaptado de Cancer Genome Atlas Research Network., 2008.

Entre todas as alterações gênicas encontradas nos pacientes com GB, o gene do EGFR aparece como o mais alterado, seja por mutações ou amplificações, podendo contribuir para o crescimento autônomo das células de câncer, inibição da apoptose, resistência ao tratamento, entre outros fenótipos. Na maioria dos casos em que um paciente possui o gene do EGFR amplificado, pelo menos uma mutação em seu gene também está presente, entre elas a que produz a proteína EGFRvIII, sendo esta a mais comum. (BRENNAN, *et al.*, 2013). O EGFR é um dos quatro receptores tirosina quinase da família dos receptores ErbB, que é constituída pelos membros ErbB1 (EGFR/HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). Os ligantes extracelulares para o EGFR incluem os fatores de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento epidermal ligado à heparina (HB-EGF) e o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α). A mutação que produz o EGFRvII ocorre através da deleção dos éxons 2 à 7 do gene do EGFR, presente no braço longo do cromossomo 7, o que leva a uma eliminação de 267 aminoácidos do domínio extracelular e rende um EGFR constitutivamente ativo sem a necessidade de ligante extracelular. Um aumento da proliferação é observado em células transfectadas com ambos os gene do EGFR, o selvagem e o da variante III, tal evento promove a heterodimerização desses receptores e posterior trans-fosforilação (LUWOR, *et al.*, 2004). O aumento da expressão do EGFRvIII na presença da amplificação em seu gene é um indicador de pior prognóstico (SHINOJIMA, *et al.*, 2003). Em células de GB, a expressão do EGFRvIII resulta em aumento da transcrição de genes de muitos ligantes extracelulares, entre eles o TGF- α e o HB-EGF, caracterizando uma ativação autócrina e parácrina desta via de sinalização (RAMNARAIN, *et al.*, 2006). A amplificação dos genes dos RTKs no GB é caracterizada como um evento tardio, e ocorre de uma forma heterogênea, ou seja, cada subpopulação do tumor pode possuir amplificações em diferentes RTKs, sendo conhecido como uma amplificação em mosaico (SNUDERL, *et al.*, 2011).

As alterações descritas nos RTKs induzem uma maior ativação de suas vias de sinalização, entre elas destacamos a via das MAPKs por ser alvo de nosso estudo. Após a autofosforilação desses receptores em aminoácidos específicos, proteínas adaptadoras se acoplam, e ocorre a ativação de outra proteína denominada Ras (homólogo ao oncogene viral *v-Ha-ras* de sarcoma de rato), pertencente a família das GTPases monoméricas. A regulação de Ras fica por conta de duas classes de proteínas, que alteram entre o seu estado ativo e inativo, como o seu regulador negativo que aumenta a velocidade de hidrólise do GTP pela

Ras, tornando-a inativa. A proteína Ras é um transdutor de sinal que quando ativo (ligado ao GTP) transmite sinais para uma cascata de serinas e treoninas kinases (MAP-quinases), conhecidas como Raf (RAF proto-oncogene serina / treonina-kinase), Mek e ERK (Proteína regulada por sinais extracelulares). Como um evento final a ERK entra no núcleo e fosforila proteínas reguladoras de genes. (YANG, *et al.*, 2013) O gene de NF1 que codifica um regulador negativo da ativação de Ras, como destacado anteriormente, apresenta uma taxa de 18% de mutação e/ou deleção, sendo o gene mais alterado da via das MAPKs, seguido pelos RTKs (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK., 2008). As alterações menos frequentes nessa via de sinalização, apresentam taxas de 1% e 2% de amplificação ou mutação nos genes RAS e BRAF, respectivamente (BRENNAN, *et al.*, 2013). A modulação da expressão de KRas em camundongos permitiu inferir que a sua expressão é essencial para a manutenção da proliferação tumoral *in vivo*, enquanto a sua inibição induz uma regreção do tumor por apoptose e aumento de sobrevida (HOLMEN e WILLIAMS, 2005). Outro estudo demonstrou que a expressão de um mutante de Raf-1 (RAF proto-oncogene serina / treonina-kinase) constitutivamente ativo induz formação de gliomas em camundongos similares aos formados pela KRas ativa, o que indica que a ativação de Raf e a sinalização por meio da via das MAPKs é importante para o efeito oncogênico de KRas na formação dos gliomas (LYUSTIKMAN, *et al.*, 2008). Além de ter encontrado aumento dos níveis da proteína Raf-1 e BRaf e da atividade quinase de Raf em amostras de GB humanas (LYUSTIKMAN, *et al.*, 2008). Análise por imunohistoquímica em pacientes com GB, da expressão de p-MAPK, revela que a elevada expressão é um fator prognóstico independente de baixa sobrevida (PELLOSKI, *et al.*, 2006).

As baixas taxas de alterações gênicas em membros da via das RAS/RAF/MEK/ERK em pacientes com GB, indica que o aumento de sua sinalização no GB é devido, principalmente, a superexpressão e/ou a superatividade dos RTKs, principalmente o EGFR e o PDGFR. Portanto, a ativação permanente dessa via é importante para a carcinogênese do GB, sendo assim motivo de estudos clínicos e pré-clínicos na geração de novas terapias alvo específicas. (LO, 2010). A maioria dos testes clínicos em pacientes com GB utilizando terapias alvo específico, inclusive que atuem sobre a via dos RTKs e em seu próprio receptor, não apresentaram resultados satisfatórios. Por isso, o que se tem buscado é a combinação de diferentes terapias alvo, com o intuito de gerar um maior espectro de inibição nos eixos sinalizadores desregulados. Além da pesquisa de novas

moléculas com um maior espectro de inibição e com o potencial de tornar-se uma futura modalidade de tratamento. Entre essas moléculas, os microRNAs se destacam.

1.3) microRNAs

O primeiro microRNA foi descoberto em 1993 no nematódo *Caenorhabditis elegans* no qual foi relatado que o gene *lin-4* transcreve pequenos RNAs com complementariedade de base aos mRNAs (LEE, *et al.*, 1993), conhecidos posteriormente como pequenos RNAs não codificantes (ncRNA, do inglês non-coding RNA). Ao longo dos anos esse pequeno ncRNA foi considerado específico aos vermes para o controle da expressão de genes codificantes. Sete anos depois, REINHART e colaboradores (2000) demonstraram que outro gene do *C. elegans*, o *let-7*, também transcrevia pequenos ncRNAs e que estes eram capazes de interagir com a região 3' do mRNA, regulando negativamente a expressão gênica. Esta descoberta estimulou os cientistas a procurarem outros ncRNAs e em 2001, três grupos independentes os identificaram, agora chamados de microRNAs, em outros organismos vertebrados e invertebrados (LAU, *et al.*, 2001 ; LEE e AMBROS, 2001 ; LAGOS-QUINTANA, *et al.*, 2001). Os microRNAs tem sido descobertos em todas as espécies de plantas e animais e a última versão do banco de dados de microRNAs (<http://www.mirbase.org/>), lançado em junho de 2014, apresenta um catalogo de 2.588 microRNAs maduros em humanos (KOZOMARA e GRIFFITHS-JONES, 2014).

Os microRNAs possuem de 19 à 25 nucleotídeos e são definidos como RNAs não codificantes de fita simples gerados a partir de transcritos endógenos em forma de grampo. Eles regulam negativamente a expressão gênica no nível pós-transcricional pelo reconhecimento de sítios complementares na região 3' dos mRNAs alvos (DI LEVA, *et al.*, 2014). Abordagens computacionais e experimentais indicam que um único microRNA pode reprimir, em média, mais do que 100 mRNAs. Além disso, mais de 60% dos genes que codificam proteínas humanas estão sob pressão seletiva para manter os sítios de ligação com os microRNAs (FRIEDMAN, *et al.*, 2009). Essas moléculas surgem como um dos reguladores da expressão gênica mais abundantes, possuindo um grande impacto em diversos processos celulares e

estando alterados em patologias como o câncer (DI LEVA, *et al.*, 2014 ; LEE e DUTTA, 2009).

1.3.1) Organização genômica, biogênese e função

Com base na sua organização genômica, os microRNAs podem ser divididos em duas classes: os microRNAs intergênicos que são unidades transcricionais independentes localizados entre os genes, e os microRNAs intragênicos que são localizados dentro de genes e são transcritos na mesma orientação destes. Os intragênicos, na sua grande maioria, são localizados dentro de introns, entretanto uma pequena porcentagem localiza-se em éxons. Mais que 50% dos genes de microRNAs são organizados em *clusters* e nesse caso podem dar origem a dois ou mais microRNAs maduros. (DI LEVA, *et al.*, 2014).

A biogênese do microRNA pode seguir um processamento canônico que começa no núcleo e termina no citoplasma e é composto de quatro eventos: transcrição, clivagem, exportação nuclear e uma nova clivagem (Figura 1.4A). Primeiro, os genes dos microRNAs são transcritos pela RNA polimerase II em precursores primários, chamados pri-miRNA, que possuem um CAP na região 5' terminal e é poliadenilado na região 3' terminal de forma similar aos mRNAs. O pri-miRNA sofre uma primeira clivagem ainda no núcleo pelo heterodímero Drosha/DGCR8 liberando um miRNA precursor ou mais, no caso dos *clusters*, (pre-miRNAs) que possui uma estrutura na forma de grampo. DGCR8 é uma proteína ligadora de RNA de dupla fita que reconhece o sítio próximo da estrutura em forma de grampo do pri-miRNA e posiciona o sítio catalítico da endonuclease RNase tipo III Drosha. A exportina 5 reconhece sítios do pre-miRNA e é responsável por exportá-lo do núcleo para o citoplasma. Por fim, há uma segunda clivagem pela endonuclease RNase III Dicer, que libera uma estrutura miRNA de fita dupla sem o grampo (duplex miRNA). O duplex miRNA se associa a proteínas formando um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), uma das fitas permanece no complexo RISC (agora chamado de miRNA maduro) e a outra fita é degradada. (DI LEVA, *et al.*, 2014).

Outra via de processamento além da via canônica tem sido descrita e pode ser chamada de miRtrons (Figura 1.4B). Essa via gera um pre-miRNA sem sofrer a etapa de transcrição e a primeira clivagem. Esse processamento se dá por *splicing*

de introns que apresentam um potencial de formar grampos. O produto do *splicing* não é linear e sim em forma de laço no qual a região terminal 3' está ligada à região terminal 5'. Após o processamento pela enzima *Lariat debranchase* o intron adota a estrutura de grampo característica dos pre-miRNA e segue as etapas posteriores descritas na via canônica (WESTHOLM e LAI, 2011).

Como citado anteriormente, os microRNAs são capazes de se parear na região 3' do mRNA e podem levar tanto à inibição da tradução, quanto à sua degradação. Quando esse pareamento é imperfeito ocorre somente a inibição da tradução sem alterar os níveis de mRNA. Contudo, quando o pareamento for perfeito o complexo RISC irá promover a clivagem do mRNA. (Figura 1.4A). Os mecanismos de clivagem do mRNA pelo microRNA ainda não foram esclarecidos completamente e portanto necessitam de mais estudos (DJURANOVIC, *et al.*, 2011).

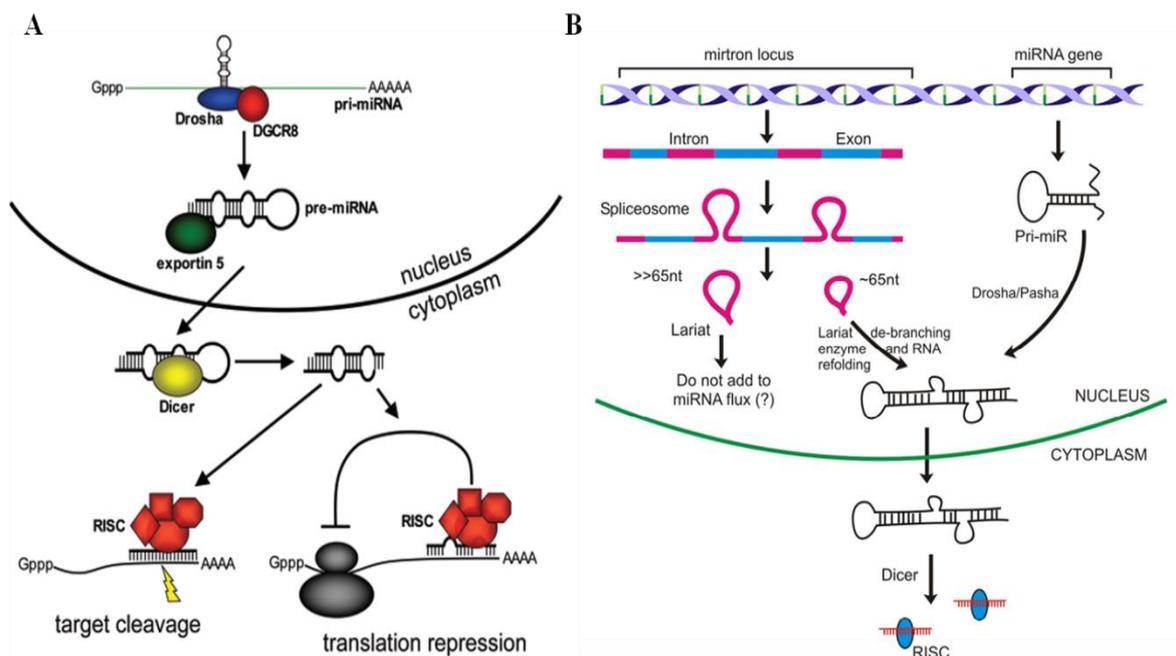


Figura 1.4 Vias de biogênese dos microRNAs e o seu mecanismo de ação. A figura representa a via canônica de formação dos microRNAs e o seu mecanismo de ação (A), bem como as diferenças entre as duas vias de biogênese dos microRNAs: a via canônica e a geração dos miRtrons (B). Adaptado de NAQVI, *et al.*, 2009.

1.3.2) microRNAs e o câncer

Os microRNAs são aberrantemente expressos em uma variedade de neoplasias. O primeiro exemplo descrito foi o miR-15a e o -16-1, clusters de microRNA localizados no locus 14 contido no braço longo do cromossomo 13 (13q14), uma região frequentemente deletada na leucemia linfóide crônica e outras neoplasias (CALIN, *et al.*, 2002). Um estudo que diminuiu a expressão de todos os microRNAs, pela deleção gênica de sua maquinaria de processamento, demonstrou que este processo favorece a transformação celular e a tumorigênese *in vivo* indicando que as alterações dos microRNAs encontradas nas neoplasias podem ser uma das causas para a iniciação do tumor (LAMBERTZ, *et al.*, 2010). Os mecanismos pelo qual a expressão dos microRNAs podem ser alterados no câncer são: anormalidade genômica, fatores epigenéticos, regulação transcricional e pós-transcricional (etapas de processamento) (LEE e DUTTA, 2009). Os genes dos microRNAs são frequentemente localizados em sítios frágeis, como em regiões comuns para a perda de heterozigosidade, amplificação ou com pontos de quebra (CALIN, *et al.*, 2004). Estas regiões são associadas ao câncer e, portanto, tornam o estudo dessas moléculas essenciais para o melhor entendimento do processo de carcinogênese.

De acordo com o conjunto de genes regulados, os microRNAs podem ser classificados como oncogênicos ou supressores tumorais. Os oncogênicos geralmente estão aumentados em uma célula de câncer, e contribuem para a carcinogênese pela inibição dos genes supressores tumorais. Os supressores tumorais previnem o desenvolvimento do câncer pela inibição dos oncogenes, e frequentemente estão diminuídos. (SHENOUDA e ALAHARI, 2009).

Pelo fato dos microRNAs estarem diferencialmente expressos entre as neoplasias, ou entre os graus de uma mesma neoplasia, os estudos têm focado no possível papel dessas moléculas como biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e resposta à terapia (HAYES, *et al.*, 2014). Como já foi dito, o microRNA possui um grande espectro de regulação da expressão gênica, pois uma única molécula pode alterar a expressão de centenas de genes, podendo contribuir para a aquisição das características de uma célula cancerosa. Portanto, os microRNAs apresentam-se como uma abordagem terapêutica relevante (HAYES, *et al.*, 2014). Descrevemos a seguir e com mais detalhes os microRNAs analisados na presente dissertação, o miR-125b e o miR-7.

1.3.2.1) microRNA-125b

A família do miR-125 está envolvida em uma variedade de carcinomas e outras doenças (SUN, *et al.*, 2013). Em humanos, a família do miR-125 é composta por três homólogos, o miR-125a, o miR-125b-1 e o miR-125b-2. O miR-125b, alvo de nosso estudo, pode ser transcrito em dois loci diferentes, diferindo apenas quanto ao pri-microRNA, apresentando o mesmo microRNA maduro. O miR-125b-1 é transcrito na região 23 do braço longo do cromossomo 11 (11q23) e o miR-125b-2 na região 21 do braço longo do cromossomo 21 (21q21) (RODRIGUEZ, *et al.*, 2004).

O miR-125b em níveis aumentados por expressão retroviral, pode atuar como um supressor tumoral, por exemplo, em linhagens de câncer de mama pela inibição da tradução de proteínas oncogênicas, como ErbB2 e ErbB3 (SCOTT, *et al.*, 2007). De outra maneira, pode atuar como um oncomiR, quando se encontra superexpresso, regulando negativamente proteínas pro-apoptóticas em câncer de próstata (SHI, *et al.*, 2011) e no GB (XIA, *et al.*, 2009). Diversos trabalhos demonstram a relação do microRNA-125b com a resistência a terapia, sendo até um marcador de quimiorresistência em câncer de mama (WANG, *et al.*, 2012).

Dentre os microRNAs que regulam o eixo da p53, o microRNA-125b ganha destaque, por regular 20 alvos da via de p53, incluindo as proteínas pro-apoptóticas, como a Bak1 (Assassino 1 antagonista de Bcl-2) e a PUMA (*P53 upregulated modulator of apoptosis*), e a própria p53 (LE, *et al.*, 2011). A superexpressão do microRNA-125b em embriões de zebrafish inibe a morte por radiação ionizante e, em células de neuroblastoma leva a diminuição do mRNA de p21, p53 e bax (Proteína x associada a Bcl-2), protegendo essas células do H-7, um indutor apoptótico (LE, *et al.*, 2009). O microRNA-125b também confere quimiorresistência através da redução dos níveis da proteína pro-apoptótica BAK1 em câncer de mama (ZHOU, *et al.*, 2010) e de ovário (KONG, *et al.*, 2011). Em GB três trabalhos se destacam: o primeiro demonstra que a superexpressão do microRNA-125b promove a proliferação de células de glioma e inibe a apoptose induzida pelo ácido trans-retinóico (XIA, *et al.*, 2009). O segundo mostra que a diminuição da expressão do microRNA-125b seguida pelo tratamento com TMZ sensibiliza as células tronco de GB a este tratamento, através das proteínas da via mitocondrial da apoptose, pela diminuição da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) e aumento da proteína pró-apoptótica Bax (SHI, *et al.*, 2012). O último reforça a ideia de que o microRNA-125b tem um papel oncogênico no GB, pois promove a proliferação

celular e inibe a apoptose, além de ser mais expresso em gliomas com maior grau de malignidade (WU, *et al.*, 2013).

1.3.2.2) microRNA-7

A identificação do microRNA-7 foi realizada em 2001, por LAGOS-QUINTANA e colaboradores. Em humanos, a sequência do micro-RNA-7 maduro consiste de 23 nucleotídeos, e é o produto da transcrição de três loci diferentes. O miR-7-1, localizado em uma região intrônica do locus 21, contido no braço curto do cromossomo 9 (9q21); o miR-7-2, localizado em uma região intergênica do locus 26, contido no braço curto do cromossomo 15 (15q26); e o miR-7-3, localizado em uma região intrônica do locus 13, contido no braço curto do cromossomo 19 (19q13) (HORSHAM, *et al.*, 2015b). Esse microRNA pode ser regulado tanto no nível transcricional, quanto pós-transcricional. Até o momento foram descritos três fatores de transcrição regulando positivamente, no nível transcricional, a expressão do promotor de miR-7 e um fator regulando negativamente (HORSHAM, *et al.*, 2015a). Um estudo em linhagem de câncer de pulmão, relatou que o fator de transcrição c-Myc (Homólogo de Oncogene viral v-myc de mielocitomatose) estimula a produção do microRNA-7, através da ativação de transcrição do promotor do miR-7-1 (CHOU, *et al.*, 2010). Em célula de câncer de mama o fator de transcrição FOXP3 (do inglês, transcription factor Forkhead box P3), quando induzido aumenta a expressão do microRNA-7, possivelmente pela ativação da transcrição, através da ligação em regiões gênicas próximas aos locus do miR-7-1 e do miR-7-2 (MCINNES, *et al.*, 2012).

ZHAO e colaboradores, em 2015, revisaram o assunto e descreveram os tipos de câncer em que o miR-7 é relacionado, e os alvos regulados pelo mesmo. O micro-RNA-7 foi descrito em 18 tipos diferentes de câncer, entre eles somente em dois possui uma função de oncogene, enquanto nos demais a sua função é de supressor tumoral. A principal via oncogênica suprimida por essa molécula, é a via dos RTKs, sendo descrito regulando duas proteínas inibidora da apoptose. (ZHAO, *et al.*, 2015). Portanto, por ser um microRNA supressor tumoral, encontra-se regulado negativamente na maior parte das neoplasias.

Os trabalhos publicados em câncer com o miR-7 evidenciam principalmente uma supressão de oncogenes, nas mais diversas vias de sinalização, modulando,

portanto, vias de proliferação, invasão, metástase, controle do ciclo celular e apoptose (GU, *et al.*, 2015). Entre outros RTKs, a via de sinalização do EGFR é regulada pelo micro-RNA7 em múltiplos níveis, modulando a expressão, de forma direta, do EGFR e de Raf1 e de forma indireta, da proteína MEK, em linhagens de câncer de pulmão, mama e GB (WEBSTER, *et al.*, 2009). Em relação à modulação da apoptose, somente dois trabalhos foram publicados. O primeiro, induziu o aumento da expressão do miR-7 em linhagens de câncer de pulmão, reduzindo os níveis de forma direta da proteína anti-apoptótica Bcl-2, mecanismo este envolvido na supressão do crescimento e indução de apoptose observada nesse modelo (XIONG, *et al.*, 2011). O segundo utilizou a mesma abordagem em células de câncer cervical, e observou uma redução da proteína inibidora de apoptose XIAP (Inibidor de apoptose ligado ao X) (LIU, *et al.*, 2013).

O padrão de expressão do microRNA-7 no cérebro sadio varia de acordo com a região, apresentando uma alta expressão no hipotálamo e na glândula pituitária, enquanto em outras regiões o padrão de expressão é baixo (HORSHAM, *et al.*, 2015b). Em GB foi observado um menor nível de expressão quando comparado ao tecido normal (VISANI, *et al.*, 2014). A análise de 752 microRNAs em soro de pacientes com GB através da técnica de *microarray*, e posterior validação, revelou que 6 microRNAs apresentam a sua expressão diferenciada, quando comparado ao soro de indivíduos normais. Dentre esses, o miR-7 exibiu uma baixa expressão em soro de pacientes com GB. (DONG, *et al.*, 2014).

Os trabalhos publicados envolvendo o miR-7 e o GB, descreve essa molécula como um supressor tumoral reduzindo o crescimento, metástase e invasão tumoral, principalmente pela regulação da via de EGFR. Essa regulação ocorre através da ligação do miR-7 na região 3'-UTR (do inglês, 3'-untranslated region) do mRNA de EGFR diminuindo a expressão de sua proteína, e de forma indireta reduzindo a fosforilação de AKT e ERK (KEFAS, *et al.*, 2008 ; WANG, *et al.*, 2013). Essa abordagem reduz a viabilidade e a invasividade nas linhagens de GB (KEFAS, *et al.*, 2008), além de induzir morte celular por apoptose, e inibir a proliferação celular, a migração e a invasão celular (WANG, *et al.*, 2013). Foi relatado ligação do miR-7 na região 3'-UTR do mRNA de PI3K e RAF1, reduzindo de forma indireta os níveis proteicos de EGFR e o nível de fosforilação da AKT e da MEK, o que inibe o crescimento celular e induz parada no ciclo celular em linhagem de GB (LIU, *et al.*, 2014a). Por fim, os níveis de fosforilação de ERK e AKT também foram reduzidos após o aumento da expressão de miR-7. Entretanto nesse trabalho a regulação

ocorreu na região 3'-UTR do mRNA FAK (Kinase de adesão focal), resultando em um fenótipo de inibição da invasão e da atividade migratória em linhagens de GB (WU, *et al.*, 2011). O papel do miR-7, como um supresor tumoral de GB, foi confirmado *in vivo*. O aumento da expressão de miR-7 em camundongos, inibiu o crescimento (WANG, *et al.*, 2013 ; BABAE, *et al.*, 2014 ; LIU, *et al.*, 2014a), reduziu os nódulos metastáticos (WANG, *et al.*, 2013), e reduziu a angiogênese (BABAE, *et al.*, 2014), de xenotransplantes de GB. miR-7 inibe a proliferação de células endoteliais vasculares pela redução de RAF1 através da ligação em seu mRNA, tal evento explica o potencial do miR-7 de regular a angiogênese (LIU, *et al.*, 2014b).

Além dos efeitos descritos anteriormente, alguns trabalhos relacionam a presença do miR-7 com a aquisição de um perfil de sensibilidade a terapia. Em um painel de linhagens de câncer humano com sinalização aumentada de EGFR, laringe, mama, pulmão e GB, quando a expressão do miR-7 foi induzida houve a atenuação da ativação dessa via, além da indução de sensibilidade à terapia com radiação ionizante (LEE, *et al.*, 2011). De uma forma semelhante, o miR-7 também foi descrito sensibilizando as células de câncer de cabeça e pescoço ao tratamento com erlotinib, um inibidor de EGFR (KALINOWSKI, *et al.*, 2012). Outro estudo verificou que células de câncer de pulmão de não pequenas células tratadas com paclitaxel (LIU, *et al.*, 2014). O miR-7 modulou a quimiorresistência através da regulação direta da bomba de efluxo de drogas MRP1 (LIU, *et al.*, 2015). O acúmulo de evidências permite dizer que o miR-7 é promissor como um possível marcador de resistência a terapia e de prognóstico. Além disso, o reestabelecimento da sua expressão em GB surge como uma abordagem terapêutica vantajosa, devido ao grande espectro de inibição em vias essenciais da carcinogênese dessa doença.

1.4) Novo composto sintético com atividade antitumoral

Considerando que o tratamento do GB é insatisfatório, torna-se imprescindível a investigação de novas drogas com atividade antineoplásica visando uma maior sobrevida para os pacientes. Desta forma, é importante levar em consideração no estudo dos novos compostos em GB, se estes modulam as vias alteradas e envolvidas na patogênese dessa doença.

Nesse contexto, o laboratório de Química Bio-orgânica, do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro

(UFRJ), sob a coordenação do Prof. Paulo R.R. Costa, e o Laboratório de Síntese Orgânica da Pontifícia Universidade Católica (PUC) coordenado pela Profa. Camila D. Buarque, vem trabalhando na síntese de compostos antineoplásicos baseados em pterocarpanos (DA SILVA, *et al.*, 2002 ; NETTO, *et al.*, 2009 ; NETTO, *et al.*, 2010 ; SALUSTIANO, *et al.*, 2010), aza-pterocarpanos e seus análogos deoxi (BUARQUE, *et al.*, 2011 ; BUARQUE, *et al.*, 2014).

No momento, três laboratórios estão envolvidos no estudo da atividade antitumoral dos novos compostos sintéticos, visando tanto o entendimento do mecanismo de ação dos compostos já estabelecidos quanto a análise do potencial antitumoral de novas moléculas. O Prof. Paulo R. R. Costa e a Profa. Vivian M. Rumjanek lideram dois laboratórios da UFRJ e a Profa. Raquel C. Maia lidera o Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular (LHOCM) do INCA, grupo no qual este trabalho está inserido. Os estudos nesses laboratórios abrangem diversos tipos de neoplasias, incluindo gliomas, câncer de mama, câncer de pulmão e leucemias.

A primeira molécula que ganhou destaque foi a pterocarpanoquinona, LQB-118. Este composto, possui efeito antitumoral em linhagens de câncer de pulmão (NETTO, *et al.*, 2010), linhagens e amostras de paciente de Leucemia mieloide crônica (LMC) (MAIA, *et al.*, 2011 ; DE FARIA, *et al.*, 2015) e Leucemia mieloide aguda (LMA) (DE SOUZA REIS, *et al.*, 2013 ; NESTAL DE MORAES, *et al.*, 2014), e em linhagens de câncer de próstata (MARTINO, *et al.*, 2014). Além do seu efeito antineoplásico, possui também efeito antiparasitário *in vitro* (PORTES Jde, *et al.*, 2012 ; RIBEIRO, *et al.*, 2013) e *in vivo* (DA CUNHA-JÚNIOR, *et al.*, 2011 ; COSTA, *et al.*, 2014). O composto LQB-118 apresenta um grupamento para-quinona em sua estrutura que, em contato com a célula, sofre biorredução, gerando bio-alquilantes intermediários ou espécies reativas de oxigênio, sendo este processo um dos responsáveis pela toxicidade causada pelo LQB-118 nas células tumorais e nos parasitas (DE SÁ BACELAR, *et al.*, 2013 ; RIBEIRO, *et al.*, 2013).

O composto, 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, denominado LQB-223 (Figura 1.5), também vem sendo estudado pelos mesmos grupos de pesquisadores. Esse composto possui um grupamento N-tosil ou Aza ($\text{NCH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2$) em um de seus anéis de carbono. E pode ser reconhecido pela fusão dos benzocarbazois com a sulfonamida. Alguns estudos demonstram que compostos contendo o radical sulfonamida possuem potencial citotóxico em linhagens tumorais pela inibição de RTKs (WINUM, *et al.*, 2012 ; LUO, *et al.*, 2011).

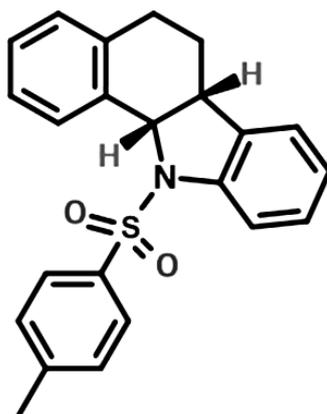


Figura 1.5 Estrutura molecular do novo composto sintético LQB-223. O 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, LQB-223, é representado nessa figura quanto a sua estrutura molecular.

O artigo que descreve a síntese do LQB-223 demonstrou que esse composto apresenta atividade antineoplásica e anti-leishmania *in vitro* (BUARQUE, *et al.*, 2011). Linhagens leucêmicas com perfil MDR também foram sensíveis ao LQB-223 (BUARQUE, *et al.*, 2014). Este composto possui atividade antimalarial em modelo de camundongo *Swiss* infectado com *Plasmodium berghei* quando administrado oralmente (CORTOPASSI, *et al.*, 2014). Além disso, não induziu toxicidade para células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis (BUARQUE, *et al.*, 2011) e células do sistema imune retirados do baço de camundongos *Swiss* e colocadas em cultura (BUARQUE, *et al.*, 2014). Ressalta-se a sua ação em linhagens com perfil MDR, cujos resultados não publicados do nosso grupo, demonstram que o LQB-223 apresenta efeito em linhagens resistente ao quimioterápico citarabina em LMA e ao quimioterápico doxorrubicina em câncer de mama.

Em relação ao seu mecanismo de ação, o LQB-223 induziu parada na fase G2/M do ciclo celular em linhagens leucêmicas com perfil MDR (BUARQUE, *et al.*, 2014). Nosso grupo também verificou este efeito em linhagens celulares de câncer de mama e leucemias de origem mielóide e linfóide (Dados não publicados). No câncer de mama os resultados indicam que a parada na fase G2/M do ciclo celular apresenta mecanismos dependentes e independentes da ativação de p53 pelo fato do efeito ter sido observado em linhagens com o gene TP53 selvagem e mutado.

Nosso grupo vem estudando o efeito de ambas as moléculas descritas em três linhagens celulares de GB, com diferentes perfis de mutações, avaliando a indução de morte celular e a relação entre os microRNAs e vias de sobrevivência e proliferação. O estudo com o LQB-118 vem sendo conduzido por Bernardo P.S., e os dados indicam que a molécula induz apoptose em linhagens celulares de GB via a inibição das vias de PI3K e MAPK e aumento dos níveis de expressão do microRNA-210, além de possuir um efeito sinérgico quando combinado com a radiação ionizante.

A presente dissertação estuda a nova molécula, 11a-N-Tosil-5-deoxipterocarpano, o LQB-223, quanto ao seu efeito antitumoral e o possível mecanismo de ação em linhagens de GB, com diferentes perfis de resistência a terapia.

2) OBJETIVOS:

2.1) GERAL

Caracterizar o perfil de radiorresistência e avaliar o efeito antitumoral e o mecanismo de ação do novo composto sintético, 11a-N-Tosil-5-deoxi-pterocarpano, LQB-223 em linhagens celulares derivadas de GB.

2.1) ESPECÍFICOS

- Verificar o perfil de radiorresistência nas linhagens de GB T98G e A172 mediante exposição à radiação ionizante;
- Avaliar a expressão do microRNA-125b, na linhagem de GB U251, mediante exposição à radiação ionizante;
- Avaliar a morfologia celular das linhagens U251, A172 e T98G de GB após a incubação com o composto LQB-223;
- Analisar a viabilidade celular e a formação de colônias das linhagens de GB após a incubação com o composto LQB-223;
- Verificar o perfil do ciclo celular e a fragmentação do DNA nas linhagens T98G e A172 após a incubação com o composto LQB-223;
- Avaliar a morte celular por apoptose e a quebra da dupla fita do DNA nas linhagens de GB incubadas com o composto LQB-223;
- Avaliar a expressão das proteínas da via das MAP kinases ERK1/ERK2 e do perfil de expressão dos microRNAs em linhagens de GB incubadas com o composto LQB-223.

3) DESENHO EXPERIMENTAL:

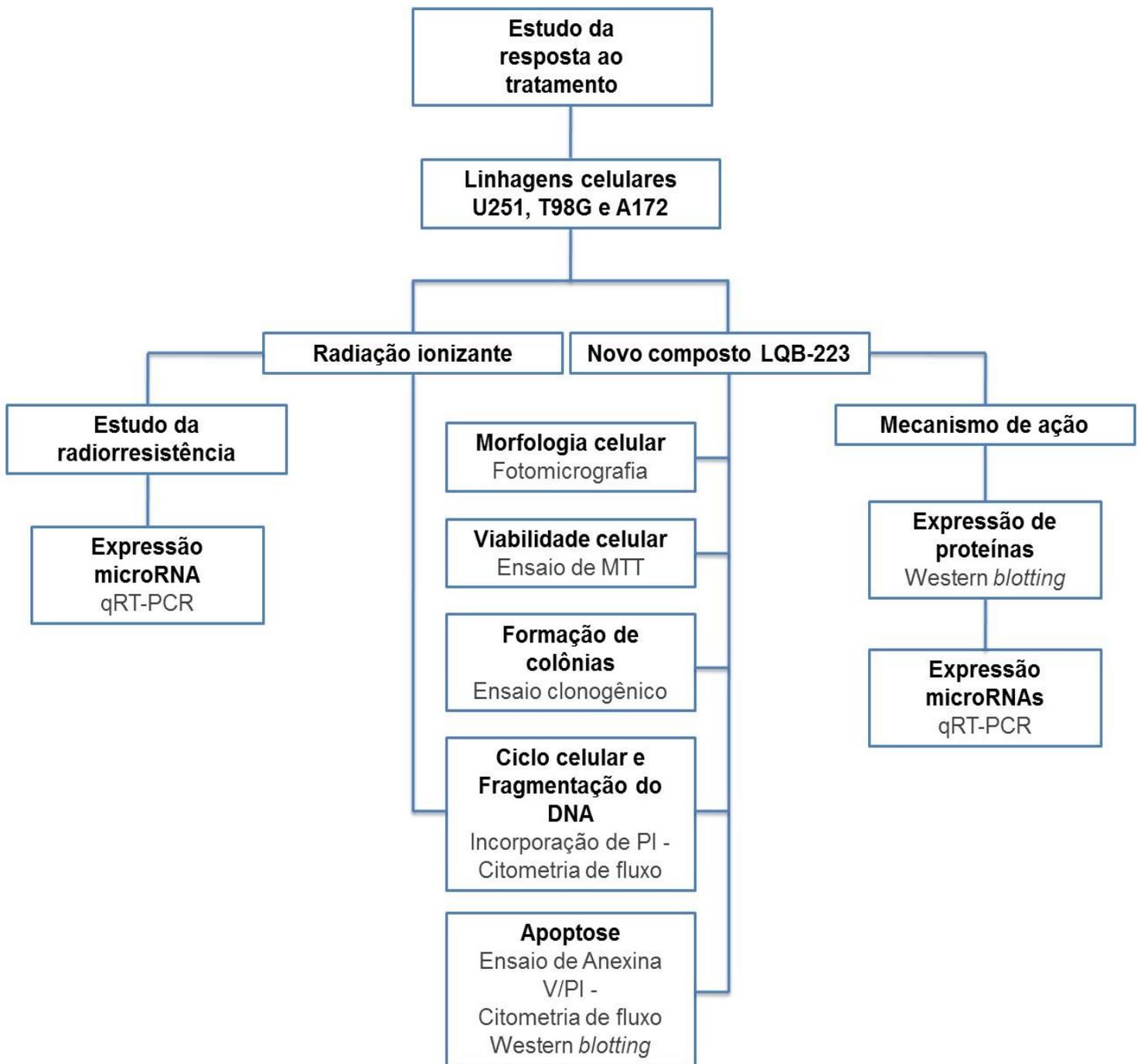


Figura 3.1. Fluxograma ilustrando o desenho experimental do estudo.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) Perfil e manejo das linhagens celulares de GB

O presente estudo utilizou três linhagens celulares derivadas de GB humano que possuem características moleculares distintas: as linhagens U251, T98G e A172. A linhagem U251 possui os genes TP53, EGFR e PTEN mutados, a T98G os genes TP53 e PTEN mutados e o EGFR selvagem, enquanto que a linhagem A172 possui os genes PTEN mutado e TP53 e EGFR selvagens. As linhagens encontram-se estocadas em nitrogênio líquido no banco de células do LHOCM, livres de micoplasma, e com perfil de repetição curta em tandem (STR) compatível com o *American Type Culture Collection* (ATCC).

Para os experimentos, inicialmente as células foram retiradas do banco, descongeladas e expandidas em garrafas plásticas de diferentes dimensões. Cultivamos as linhagens em monocamada, acondicionadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ e mantidas em meio GIBCO® Meio de Dulbecco modificado por eagle: Mistura nutriente F-12 (DMEM-F12) suplementado com L-glutamina (GIBCO™), 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, GIBCO™), penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (0,1 mg/mL). As linhagens foram consideradas próprias para a inicialização dos experimentos quando adquiriam uma confluência de 70-90%. A partir desse momento, as células foram soltas da garrafa de cultura com uma solução contendo 0,125% de tripsina-EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) 1x (GIBCO®), centrifugadas em 771 G por 3 minutos com aceleração e desaceleração de 6 em uma Alegra™ X-22R Centrifuge Beckman Coulter™, contadas em câmara de *Neubauer* e plaqueadas em novas garrafas ou placas nas concentrações definidas de acordo com o experimento em questão (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Densidade celular utilizada nos experimentos

Garrafa ou Placa	Experimento	Área	Nº de células	Volume
Placa 96 poços	MTT (LQB-223)	0,32 cm ²	1 x 10 ⁴	200 µl
Placa 6 poços	Citometria de fluxo e Fotomicrografias (LQB-223)	9,6 cm ²	3 x 10 ⁵	2 ml
Placa 6 poços Clonogênico	Clonogênico (LQB-223)	9,6 cm ²	2000	2 ml
Garrafa P	Citometria de fluxo e qRT-PCR (Radiação)	25 cm ²	7 x 10 ⁵	8 ml
Garrafa G	WB e qRT-PCR (LQB-223)	150 cm ²	4,2 x 10 ⁶	40 ml

Condições experimentais para o plaqueamento de cada experimento em questão. Levou-se em consideração a garrafa ou placa utilizada bem como sua área, o volume o número de células. P= pequena; G= grande; WB= Western *blotting*; qRT-PCR= reação da transcriptase reversa seguida pela reação quantitativa de amplificação em cadeia da DNA polimerase.

Após o plaqueamento, foi dado um tempo de 18-24 h para as células aderirem ao fundo da garrafa ou a placa e as linhagens foram submetidas aos tratamentos com os compostos com um tempo de incubação pré-definido descrito nos tópicos 4.3 e 4.4.

Com intuito de preparar as células para os ensaios de ciclo celular, da fragmentação do DNA e de Anexina V/PI, além da análise da expressão proteica por Western *blotting* (WB) e detecção dos níveis de expressão do microRNA após o tempo de incubação pré-definido, foram seguidos os seguintes passos em comum. Inicialmente, as células foram lavadas duas vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) e colocadas em estufa durante 1-3 min com uma solução contendo tripsina a fim de descolar as células da monocamada. Após a soltura, as células foram transferidas para um tubo contendo SFB para inativar a tripsina, centrifugadas em 771 G com aceleração e desaceleração de 6, por 3 minutos e lavadas duas vezes com PBS. Para os experimentos de WB e detecção dos níveis de expressão de microRNA, as células foram centrifugadas mais uma vez, e o *pellet* seco transferido para um tubo transparente de fundo cônico do tipo *ependorf*, cujo armazenamento foi realizado em freezer -20°C e nitrogênio líquido, respectivamente, até o seu processamento. Para os experimentos cuja análise dependia do citômetro

de fluxo as células foram contadas, após a sua preparação, evitando o uso de um grande número de células e um potencial entupimento do citômetro e transferidas para um tubo de citômetro (FACS – Fluorescence Activated Cell Sorter). A preparação do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e clonogênico seguiu passos específicos descritos respectivamente nos tópicos 4.6 e 4.7.

4.2) Autenticação e controle de qualidade das linhagens celulares de GB

Nosso laboratório mantém uma rotina de autenticação e controle de contaminação por micoplasma das nossas linhagens celulares, produzindo dessa forma dados fidedignos e reprodutíveis, assim como proposto por YU, M. e colaboradores (2015). A análise do STR é um teste padrão recomendado pela ATCC para autenticação de células humanas (BARALLON, et al., 2010). STR é um sinônimo de microssatélites, que são pequenas repetições em *tandem* de sequências de DNA de até seis pares de bases (pb), podendo chegar a um máximo de 100 pb, aproximadamente. Os microssatélites apresentam uma alta taxa de mutação gerando um pequeno aumento ou diminuição no número total de unidades, dessa forma resulta em linhagens celulares com diferentes variações de microssatélites para um determinado alelo.

Enviamos nossas linhagens em *pellet* seco para dois laboratórios, visando à análise de autenticação das nossas linhagens. O DNA foi extraído e o STR realizado por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). A linhagem U251 foi avaliada no laboratório de Progenética (<http://www.progenetica.com.br/>) e as linhagens T98G e A172 no Laboratório de Diagnósticos por DNA - DECOL - IBRAG na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Foram amplificados quinze locus de STR e o locus amelogenina a fim de caracterizar o gênero das linhagens celulares. Os resultados gerados foram comparados com aqueles presentes no banco de dados do ATCC (<http://www.atcc.org/>). Todas as linhagens do nosso laboratório tiveram o perfil compatível com aqueles depositados no banco de dados em questão (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Autenticação das linhagens celulares de GB pelo perfil STR, avaliado por PCR

LOCUS	ALELO	U251		T98G		A172	
		ATCC	LHOCM	ATCC	LHOCM	ATCC	LHOCM
Amelogenina	1	X	X	X	X	X	X
	2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
CSF1PO	1	11	11	10	10	9	9
	2	12	12 13	12	12	12	12
D13S317	1	11	11	13	13	11	11
	2	10	11	13	13	11	11
D16S539	1	12	12	13	13	12	12
	2	12	12	13	13	12	12
D5S818	1	11	11	10	10	11	11
	2	12	12	12	12	12	12
D7S820	1	10	10	9	9	11	11
	2	12	12	10	10	11	11
THO1	1	9,3	9,3	7	7	6	6
	2	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3
TPOX	1	8	8	8	8	8	8
	2	8	8	8	8	11	11
vWA	1	16	16	17	17	20	20
	2	18	18	20	20	20	20
D8S1179	1		13		13		13
	2		15		14		14
D21S11	1		29		28		28
	2		29		28		32,2
D3S1358	1		16		16		14
	2		17		16		18
D2S1338	1		24		19		20
	2		24		24		21
D19S433	1		13		12		12
	2		15		12		15,2
D18S51	1		13		13		12
	2		13		16		13
FGA	1		21		21		20
	2		25		21		22

As linhagens celulares de glioblastoma U251, T98G e A172 foram autenticadas quanto ao seu perfil de STR, por PCR, em quinze locus diferentes e ao locus amelogenina, com o objetivo de avaliar o gênero destas. Os resultados foram comparados com um banco de dados presente no ATCC.

Avaliamos também a presença de contaminante por micoplasma nas três linhagens de GB pelo Myco Sensor PCR Assay Kit da Agilent Technologies. Como resultado, não houve amplificação do produto indicando que as linhagens celulares não estavam contaminadas com micoplasma.

4.3) Exposição à radiação ionizante

As células foram irradiadas em temperatura ambiente no setor de fracionamento do Serviço de Hemoterapia, do Hospital do Câncer 1 (HC1), utilizando-se o irradiador IBL 437C[®] Irradiator - type H. O equipamento utiliza como fonte de emissão de radiação gama o Césio 137. O cálculo da dose foi realizado seguindo uma tabela pré-definida pelo setor no qual considera a quantidade de Gy por minuto (Gy/min). Foi utilizada as doses de radiação de 2, 4, 8, 16 e 24 Gy. O grupo não irradiado (controle) seguiu todos os passos dos grupos irradiados, ou seja, o tempo em que as células permaneceram em temperatura ambiente e o deslocamento destas para o laboratório.

4.4) Tratamento das linhagens de GB com o novo composto, LQB-223

O composto LQB-223 foi dissolvido em dimetilssulfóxido (DMSO) na concentração estoque de 25 mM e armazenado em *freezer* à -20°C por um período máximo de uma semana. A partir da concentração estoque, o LQB-223 foi diluído em DMEM-F12 nas concentrações de 0,5, 1, 2,5, 5, 10 e 20 µM e adicionado as placas ou garrafas de acordo com experimento em questão. Dados não publicados do nosso laboratório demonstram que o LQB-223, não é tóxico para as células PBMC, até a concentração de 20 µM. As concentrações utilizadas neste estudo foram baseadas nos testes de toxicidade em PBMC. Utilizamos dois controles: Um, contendo as linhagens incubadas somente com DMEM-F12, denominado controle, e outro contendo as linhagens incubadas com DMSO diluído em DMEM-F12 na mesma diluição da concentração de 20 µM de LQB-223, denominado DMSO.

4.5) Avaliação da morfologia celular em microscópio óptico invertido

Avaliamos a morfologia celular das linhagens U251, T98G e A172 incubadas com as concentrações de 5 e 20 μM de LQB-223 nos tempos de 24 e 48 h. Para isso, retiramos cinco fotos representativas de cada condição no aumento de 10x da lente objetiva, na câmera Digital Sight DS-2 MV Nikon acoplada ao microscópio óptico invertido Nikon Eclipse TS100. O programa Bell View foi utilizado na aquisição das imagens. Escolhemos as fotos representativas a partir de dois experimentos.

4.6) Ensaio de viabilidade celular por MTT

Com o objetivo de avaliar o efeito do LQB-223 na viabilidade celular das linhagens U251, T98G e A172, utilizamos o método de MTT. Este método se baseia na medição da atividade metabólica de enzimas desidrogenases mitocondriais. O brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um sal de tetrazólio de coloração amarela que é substrato das enzimas desidrogenases, associadas ao NADPH e ao NADH, presentes nas mitocôndrias. Quando reduzido por essas enzimas, através da clivagem do anel tetrazólico forma, como produto, cristais insolúveis. Tal reação só ocorre em células metabolicamente ativas. Os cristais só podem ser dissolvidos com solventes orgânicos, como o DMSO. Após a diluição, os sais exibem uma coloração violeta, permitindo assim a sua quantificação através da espectrofotometria. Portanto, quanto maior a densidade óptica gerada pela leitura no espectrofotômetro maior é o metabolismo mitocondrial da célula, logo maior o número de células viáveis (Mosmann, 1983).

As células foram plaqueadas de acordo com a Tabela 4.1 e o composto incubado nas concentrações de 0,5, 1, 2,5, 5, 10 e 20 μM por 24, 48 e 72h em estufa úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C. Foi adicionado 20 μL de MTT (na concentração final de 5mg/mL em PBS pH 7,4- Sigma) quatro horas antes do término dos tempos estabelecidos para cada incubação. Durante as quatro horas restantes as placas foram mantidas em estufa e após esse tempo, foram retirados 180 μL do sobrenadante de cada poço e adicionados 150 μL de DMSO. As placas foram agitadas em TS-20A VDRL *Shaker* (Biomixer) até a completa dissolução dos cristais, gerando a coloração violeta característica. Posteriormente, a placa de 96 poços foi lida pelo espectrofotômetro, EZ Read 400 Microplate Reader –Biochrom, utilizando o

comprimento de onda de 570nm. Os resultados foram analisados através da seguinte fórmula: [(Absorbância das células tratadas/Absorbância das células Controle) x 100]. Os resultados finais foram obtidos pela média de três experimentos independentes com triplicatas para cada concentração.

4.7) Formação de colônias pelo ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico avalia a capacidade proliferativa de uma ou um conjunto de células ao longo dos dias, ou seja, a capacidade de uma célula em formar uma colônia. Dessa forma, é necessário o plaqueamento de uma quantidade reduzida de células. Utilizamos esse ensaio a fim de analisar se o tratamento com o LQB-223, nas linhagens U251 e T98G, diminuiria a formação de colônias.

Como descrito na Tabela 4.1 um total de 2000 células da linhagem U251 e da T98G foram semeadas na placa de seis poços (9,6 cm²) e tratadas com as concentrações de 2,5, 5, 10 e 20µM de LQB-223 durante 24h, após o tempo de adesão. Em seguida, o meio das células foi trocado e as linhagens mantidas durante 7 -14 dias com troca de meio a cada 4 - 5 dias. O crescimento das colônias foi acompanhado ao longo dos dias em microscópio óptico e o ensaio terminado no momento em que as colônias estivessem grandes e definidas. A partir dessa etapa, o meio foi retirado e a placa foi lavada uma vez com PBS pH 7,4. Posteriormente, fixamos as colônias com 1 ml de paraformoldeído à 4% por 10 minutos, lavamos três vezes as placas com PBS, adicionamos 1 ml de cristal violeta (0,5% diluído em água destilada) em cada poço e agitamos as placas em temperatura ambiente por 1 hora. Por fim, as placas foram lavadas três vezes com água, secadas de um dia para o outro e fotografadas. A figura representativa do experimento foi escolhida entre os dois experimentos realizados.

A diferença do crescimento das colônias entre os grupos experimentais foi quantificado pela coloração gerada do cristal violeta diluído. Para isso, dissolvemos os cristais em 1 ml de ácido acético a 33%, agitamos até uma completa dissolução dos cristais e transferimos o líquido de cada grupo em triplicata para uma placa de 96 poços. Mensuramos a densidade óptica de cada ponto da placa em espectrofotômetro EZ Read 400 Microplate Reader –Biochrom, no comprimento de onda de 595nm. Os resultados foram analisados através da seguinte fórmula: [(Absorbância das células tratadas/Absorbância das células Controle) x 1]. Os

resultados finais foram obtidos pela média de dois experimentos independentes, com triplicatas para cada concentração.

4.8) Ensaio do ciclo celular e da fragmentação do DNA

Com a intenção de avaliar se o tratamento com o composto LQB-223, nas linhagens U251, T98G e A172, modificaria o perfil do ciclo celular e a fragmentação do DNA, realizamos os respectivos ensaios pela marcação com iodeto de propídeo (PI), um marcador fluorescente de ácido nucléico, quantificado em citometria de fluxo.

O ensaio do ciclo celular permite quantificar o número de células presentes em cada fase do ciclo, G₀/G₁, S e G₂/M, pela emissão de fluorescência específica de cada fase. A fluorescência emitida pelo PI é maior em células que possuem um maior conteúdo de DNA, ou seja, aquelas que estão com o DNA duplicado e prontas para se dividirem (Fase G₂/M; 4n) terão a maior emissão, seguidas pelas células que estão em processo de síntese do seu material genético (Fase S; >2n e <4n) com uma emissão intermediária e aquelas que ainda não entraram em processo de duplicação do DNA (Fase G₀/G₁; 2n) com a menor emissão.

O ensaio da fragmentação do DNA permite quantificar o número de células com o DNA fragmentado (Fase sub G₀/G₁). A fragmentação do DNA é um evento que ocorre em células que estão em processo de morte celular. Estas, quando marcadas com PI, apresentam uma menor emissão de fluorescência quando quantificadas pelo citômetro de fluxo.

Como relatado na Tabela 4.1 um total de 3×10^5 células da linhagem U251, T98G e A172 foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas na concentração de 5, 10 e 20 μ M de LQB-223 durante 24h para o ensaio do ciclo celular e 24, 48 e 72h para o ensaio de fragmentação do DNA.

Após o tempo de incubação, as células foram processadas como descrito no item 3.1. Em seguida, cada tubo foi centrifugado a 771 G por 3 minutos com aceleração e desaceleração de 6 minuto em temperatura ambiente. Ao *pellet* foi adicionado 150 μ L de RNase (ribonuclease A 100 μ g/ml diluída em tampão citrato 40mM) e 150 μ L de PI (50 μ L/ml diluído em tampão de citrato 4mM e 0,3% TritonX-100). Foi dado um tempo de incubação de 15 minutos antes dos tubos serem levados para leitura em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™, no qual foi adquirido

um mínimo de 10.000 eventos. Os dados foram analisados pelo programa Summit v4.3 para cada ensaio e apresentados como uma figura representativa para o ensaio do ciclo celular e um gráfico obtidos pela média de três experimentos independentes.

O uso do detergente Triton X-100 se deve ao fato de que o PI não atravessa a membrana íntegra da célula, permitindo-o se intercalar com o material genético de células com o DNA fragmentado, mas que ainda não perderam a integridade da membrana. O uso do reagente RNase é para evitar resultados falso positivos, visto que o PI se intercala em ácidos nucleicos e portanto em RNAs.

4.9) Ensaio de Anexina V/PI

Para avaliar se o tratamento com o composto LQB-223 induziu morte celular por apoptose nas linhagens U251, T98G e A172, realizamos o ensaio de anexina V/PI, indicativo desse tipo de morte, pela dupla marcação com PI e anexina V quantificado por citometria de fluxo.

Dentre as diversas alterações presentes em uma célula em apoptose, uma delas é a perda da simetria da membrana plasmática, resultando na exposição da fosfatidilserina (FS) para a face externa da membrana. Esta alteração é caracterizada como um evento precoce da apoptose. A anexina V faz parte de uma família de proteínas que possuem a capacidade de se ligar a fosfolípidios da membrana plasmática de forma dependente de cálcio, portanto à FS exposta. Este ensaio é realizado com a marcação de dois fluorocromos, o PI e a proteína anexina V conjugada ao fluorocromo Alexa Fluor[®] 488 (anexina V-A488 - life Technologies). Ambos, não atravessam a membrana plasmática íntegra. Por esta razão, durante a aquisição e a análise do ensaio quatro possibilidades de marcação aparecem, sendo estas representadas por quadrantes. O quadrante em que a fluorescência é negativa para os dois fluorocromos representa a quantidade de células vivas, pelo fato da membrana permanecer íntegra e não haver exposição da FS. O segundo quadrante em que somente a fluorescência do anexina V-488 é detectada se refere às células em apoptose inicial apenas com a FS exposta. O terceiro em que as duas fluorescências são detectadas representa as células em apoptose tardia, portanto existe FS exposta e perda de integridade de membrana. E o último quadrante quando somente existe a fluorescência do PI descreve as células com perda de

integridade de membrana sem exposição de FS, podendo esse evento ser caracterizado como necrose.

Como relatado na Tabela 4.1 um total de 3×10^5 células das linhagens U251, T98G e A172 foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas na concentração de 5, 10 e 20 μM de LQB-223 durante 48 e 72h. Dado o tempo de incubação, as células foram processadas como descrito no item 4.1. Em seguida, cada tubo foi centrifugado a 771 G por 3 minutos com aceleração e desaceleração de 6 em temperatura ambiente. Ao *pellet* foi adicionado 1mL de PBS + BSA 10% (albumina sérica bovina) durante 30 minutos a fim de recuperar e manter a integridade da membrana. Passado esse tempo, os tubos foram centrifugados e adicionamos 100 μL de uma solução de anexina V-A488 diluída em tampão de ligação 1x (2,0 μL de anexina V + 98 μL de tampão de ligação 1x). O tampão de ligação é fornecido 10x concentrado (10x Annexin V Binding Buffer, BD Pharmingen™) e foi diluído em água Milli-Q. A solução foi incubada durante 15 minutos e após esse período foi adicionado 300 μL de tampão de ligação 1X. O ensaio necessita de um controle negativo, no qual não recebe nenhum fluorocromo. Por fim, os tubos foram levados para a leitura da fluorescência em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™. Após o procedimento anterior e no momento da aquisição foi adicionado 1 μL de PI a 50 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma). A aquisição foi efetuada nos canais FL-1 (530nm) para a leitura da fluorescência da anexina V e FL-3 (613nm) para o PI. Foram adquiridos um mínimo de 10.000 eventos por amostra e a análise realizada pelo programa Summitv4.3. Para o cálculo da apoptose total, células anexina V⁺, foi realizado a soma da apoptose inicial (anexina V+/PI-) + apoptose tardia (anexina V+/PI+). A apoptose total analisada no controle foi considerada como apoptose espontânea. O índice de apoptose induzida pelo composto LQB-223 foi obtido da seguinte forma: percentual de células em apoptose nos tubos tratados subtraído o percentual de células em apoptose espontânea, sendo possível observar a real indução de apoptose pelos tratamentos. Os resultados finais foram obtidos pela média de três experimentos independentes.

4.10) Análise da expressão protéica por Western blotting (WB)

Com a intenção de avaliar a modulação da expressão das proteínas Ras, ERK, p-ERK, p-H2AX, caspase-3, caspase-3 clivada, Hsc70 e β -actina, induzida

pelo composto LQB-223 nas linhagens celulares de GB, utilizamos a técnica de WB que compreende várias etapas. Inicialmente, as proteínas foram extraídas. Em seguida, quantificadas e desnaturadas, separadas de acordo com o seu peso molecular em gel de poliacrilamida, transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose e imunomarcadas utilizando anticorpos específicos. Um total de $4,2 \times 10^6$ células da linhagem U251, T98G e A172 foram semeadas em garrafas plásticas G (Tabela 4.1) e incubadas com 5 e 20 μM de LQB-223 durante 24 e 48 h. Após o tempo de tratamento as células foram processadas como descrito no item 3.1.

Primeiramente as proteínas foram extraídas do *pellet* seco armazenado em freezer -20°C . Para esse procedimento utilizamos o Cell Extraction Buffer da Invitrogen de acordo com as instruções do fabricante.

Após a extração, as proteínas foram quantificadas pelo kit *DC protein assay* (BIO-RAD), segundo o método de Lowry (LOWRY, et al., 1951), de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizada uma curva padrão com a proteína BSA nas concentrações de 0,2 – 1,4 mg/L. As absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de 620nm utilizando o aparelho EZ Read 400 Microplate Reader - Biochrom. Em seguida a quantificação, separamos 30 μg de proteína para cada tratamento e acrescentamos 10 μL de tampão de amostra (Tris-HCL 0,06 M; pH 6,8; SDS 2%; glicerol 10%; Azul de bromofenol 0,025% e β -mercaptoetanol 200mM).

As proteínas acrescentadas com o tampão de amostra foram aquecidas por 5 minutos a 95°C para desnaturação, antes do início da eletroforese unidimensional por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de Sódio). Esta etapa tem como princípio a separação das proteínas de acordo com seu peso, mensurado em KDa, em gel redutor submetido a uma corrente elétrica. A corrida foi realizada na cuba de eletroforese vertical (Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell – BIO-RAD) em gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida) a 30% na razão 29:1 (30% Acrylamide/Bis Solution 29:1 – BIO-RAD). Dois géis foram preparados com diferentes porcentagens de poliacrilamida. O gel inferior, conhecido como gel de resolução, separa as proteínas de acordo com o seu peso molecular e é composto por uma solução de 10 ml de poliacrilamida a uma concentração de 12% (3,4 ml de água MilliQ; 4 ml de acrilamida 30%; 2,5 ml de TRIS-HCl 1,5M pH 8,8; 0,1 ml de SDS 10%; 50 μl de APS 10% e 5 μl de TEMED). Após a polimerização do gel de resolução, foi feito um gel de empilhamento composto por uma solução de 10 ml de poliacrilamida a uma concentração de 4% (6,1 ml de água MilliQ; 1,3 ml de acrilamida 30%; 2,5 ml de TRIS 0,5M pH 6,8; 0,1 ml de SDS 10%; 50 μl de APS 10%

e 10 µl de TEMED). O pente para a formação dos poços foi inserido no gel de empilhamento e após completa polimerização foi acrescentado o tampão de corrida (Tris 0,025M; glicina 0,250M e SDS 0,1% (p/v), pH 8,3). Por fim, as amostras e o padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™) foram aplicados e a eletroforese realizada com uma corrente de 120 V com duração de 40-60 minutos.

Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran™ Membranes, GE Healthcare), a fim de que se tornem acessíveis à detecção do anticorpo. Para a transferência, a membrana foi colocada sobre dois pedaços de papel de filtro umedecido com tampão de transferência (25mM de TRIS; 192mM de glicina e 20% de metanol), por cima desta foi colocado o gel sobreposto por mais dois pedaços de papel de filtro. Este “sanduíche” foi levado para a cuba de transferência úmida (Mini Trans-Blot® Cell – BIO-RAD), onde foram mantidos imersos em um tampão de transferência por 1 hora e 30 minutos a uma corrente de 100 V. Após transferência a membrana foi lavada uma vez com TBS + Tween– TBS-T (Tris – HCL 10mM, pH 8,0; NaCl 150 mM e Tween-20 0,05%, pH 7,4). Para verificar se a transferência foi eficiente, as membranas foram coradas com vermelho de *Ponceau* (0,1% de *RougePonceau*, 5% de ácido acético glacial e q.s.p 100 ml de água Milli-Q), digitalizadas e as imagens geradas armazenadas.

Para a imunomarcação, as membranas foram bloqueadas por 1 hora em uma solução a 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada com diferentes anticorpos primários (Tabela 4.3), individualmente, e *overnight*. No dia seguinte, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T por 5 minutos e incubada por 1 hora com os respectivos anticorpos secundários (Tabela 4.3) conjugados a *HorseRadish-Peroxidase*(HRP), Sigma-Aldrich, sob agitação. Seguimos a descrição do *DataSheet* para a diluição dos anticorpos. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos com TBS-T e as bandas protéicas de interesse preparadas para a revelação pelo método de quimioluminescência, utilizando o Kit ECL (Amersham™ ECL™ Prime, GE HealthCare®), de acordo com as especificações do fabricante. A quimioluminescência foi captada pelo aparelho C-DiGitBlot® Scanner, Li-COR com o auxílio do programa Image Studio Lite. Os dados apresentados na Tabela 4.3, referentes aos anticorpos primários, levou em consideração o número de catálogo,

isotipo, diluição e fabricante. O DataSheet foi consultado, para saber a solução de diluição de cada anticorpo.

Tabela 4.3. Anticorpos primários utilizados no estudo do mecanismo de ação do LQB-223

Anticorpo primário	Catálogo	Isotipo	µl/ml	Fabricante
Ras	3339	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
ERK	4695	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
Fosfo-ERK	70001	Rabbit	1:1000	Invitrogen
Fosfo-H2A.X	9718S	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
Caspase-3	sc-7148	Rabbit	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Caspase-3 Clivada	9664	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
HSC70	sc-7298	Mouse	1:000	Santa Cruz Biotechnology
β-actina	A5441	Mouse	1:10.000	Sigma-Aldrich

Cell Signaling: Danvers, MA, US; Santa Cruz Biotechnology : Santa Cruz, CA, US; Sigma-Aldrich: St Louis, MO, US

4.11) Detecção dos níveis de expressão dos microRNA-7 e 125b

Com o objetivo de avaliar a modulação da expressão do microRNA-7 e -125b após o tratamento com o novo composto ou pela exposição a radiação ionizante, nas linhagens U251, T98G e A172, utilizamos a técnica de qRT-PCR, (reação da transcriptase reversa seguida pela reação quantitativa de amplificação em cadeia da DNA polimerase) pelo método de TaqMan. Antes de realizar o PCR quantitativo, foi preciso extrair o microRNA, quantificá-lo e sintetizar o DNA complementar (cDNA).

Um total de 7×10^5 células da linhagem U251 foram plaqueadas em garrafas plásticas P (Tabela 4.1), expostas as doses de radiação de 8 e 16 Gy e deixadas em estufa durante 24 e 48h. Um total de $4,2 \times 10^6$ células da linhagem U251, T98G e A172 foram semeadas em garrafas plásticas G (Tabela 4.1) e incubadas com 5 e 20 µM de LQB-223 durante 24h. Após o período de tratamento as células foram processadas como descrito no item 4.1.

O *pellet* seco dos tratamentos armazenados em nitrogênio líquido, foram processados para a extração do microRNA. Para este procedimento, foi usado o Kit

miRvana[™] miRNA Isolation da Ambion de acordo com as instruções do fabricante. O microRNA extraído foi armazenado a -80°C.

O microRNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando um NanoDrop[™] 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). A leitura do microRNA se deu na faixa de absorvância de 260nm e para a determinação do grau de pureza, a leitura foi na faixa de 280nm, que é proporcional a quantidade de proteínas e fenol. O grau de pureza foi calculado através da razão 260/280 que deve estar entre 1,8 e 2,0. As amostras dentro dessa faixa foram consideradas puras e usadas nas etapas posteriores.

Para realizar o PCR em tempo real, o microRNA precisa ser sintetizado em cDNA, para isto foi realizado o procedimento da *Reverse Transcription* (RT). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription*. Os iniciadores da RT foram fornecidos juntamente com as sondas no Kit, *TaqMan® MicroRNA Assays*. Para cada alvo, miR-7, -125b e RNU6B (endógeno), foi realizada uma síntese de cDNA específica utilizando os iniciadores fornecidos. Os iniciadores para a síntese de cDNA a partir de microRNAs, apresentam uma estrutura em grampo que aumenta a especificidade da reação. Para dar início a reação é realizada um Mix, no qual contém todas as moléculas necessárias para a RT, em um tubo estéril formando uma solução final de 7µL. O mix contém 0,15 µL de dNTPs 100mM (desoxirribonucleotídeo trifosfato), 1,0 µL de enzima RT (*MultiScribe*[™] *Reverse Transcriptase* 50U/µL), 1,5µL de tampão RT (10X *Reverse Transcription Buffer*), 0,19 µL de inibidor de RNase (*RNaseInhibitor* 20U/µL) e 4,16 µL de água livre de nuclease. A esse mix foi adicionado 3µL de iniciador (5X RT *primer*) e 5µL da amostra de interesse contendo 50ng de microRNA. O tubo contendo o mix, o iniciador e o microRNA foi centrifugado e colocado no termociclador (*PeltierThermalCycler* (PTC-100) Bio-Rad) para a reação de síntese. Esta seguiu os seguintes ciclos de temperatura: 30 minutos a 16°C, seguido de 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C e 4°C ∞. Após esse procedimento o cDNA foi armazenado a -20°C.

Os níveis de microRNA presentes em cada amostra foram detectados pela reação de PCR em tempo real. Esta técnica promove, através de variação de temperatura, a duplicação de cadeias de DNA utilizando nucleotídeos, sequências iniciadoras (*primers*) e a enzima polimerase. Desse modo, é possível a obtenção de milhares de cópias de uma sequência específica de DNA a partir de uma fita molde. O PCR em tempo real é capaz de quantificar as cópias produzidas. Foi utilizada a

metodologia TaqMan. Esta apresenta como componentes, iniciadores (primers) não marcados para amplificação da sequência de interesse (concentração final de 900 nM cada, *AppliedBiosystems*), uma sonda TaqMan MGB [MGB (*minorgroovebinder*), que aumenta a temperatura de fusão (T_m) sem aumentar o tamanho da sonda] (*AppliedBiosystems*), com fluorocromo repórter 6-FAM (6-carboxilfluoresceína) ligado à porção 5' da sonda, um *quencher* não fluorescente na porção 3' da sonda para detecção da sequência de interesse (concentração final de 250 nM), *Master Mix* com *AmpErase UNG* (*AppliedBiosystems*), DNA polimerase (*AppliedBiosystems*) e cDNA.

Durante a PCR, a sonda TaqMan anela especificamente na sequência complementar entre os iniciadores senso e antisenso. Quando a sonda está intacta, a proximidade do fluorocromo *reporter* ao *quencher* resulta em supressão da fluorescência primária. A DNA polimerase cliva somente sondas que estão hibridizadas ao alvo. A clivagem separa o fluorocromo *reporter* do *quencher*, resultando em aumento da fluorescência emitida pelo *reporter*. O aumento do sinal de fluorescência ocorre somente se a sequência alvo for complementar à sonda, sendo amplificada durante a PCR. Por exigir essa especificidade nenhuma ligação inespecífica é detectada (BUSTIN, 2002).

Foi escolhido como controle endógeno o RNU6B, utilizado como controle de expressão basal. Como calibrador foi utilizado o grupo sem tratamento (controle) das linhagens estudadas, tanto do experimento com a radiação ionizante quanto com o novo composto. A reação usada para o PCR em tempo real possui um volume final de 20 μ L por poço, contendo 1 μ L de sonda (*20xTaqMan Gene Expression Assay*, *Applied Biosystems*), específica para o microRNA-7, -125b e o RNU6B, 10 μ L de *Master Mix* (*2X Taq Man Universal Mix*), 6,5 μ L de água autoclavada e 2,5 μ L de cDNA. Cada reação desta, para cada microRNA e o endógeno, foi aplicada na placa de PCR e a mesma foi fechada com tampas óticas (*AppliedBiosystems*). Após esse procedimento a placa foi levada para o termociclador (*StepOne*, *Applied Biosystems*) e a reação seguiu os seguintes ciclos de temperatura: 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a finalização da reação os valores de C_T (*CycleThreshold*) foram exportados para uma planilha do Excel e analisados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Os valores de C_T indicam o número fracionário de ciclos em que a quantidade de alvo amplificado ultrapassa um limiar fixado (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

4.12) Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPadPrism 5.0. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Para a análise dos experimentos envolvendo o composto LQB-223 só foi considerado o valor de p quando os tratamentos eram estatisticamente significativos tanto em relação ao DMSO quanto ao Controle, e utilizamos o valor de p em relação ao DMSO. Os resultados de expressão de microRNA foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, observando-se uma eficiência de reação igual ou maior que 95%.

5) RESULTADOS

5.1) Descrição do perfil de radiorresistência

A radiação ionizante é um dos tratamentos padrões para o GB, entretanto os pacientes apresentam alta resistência a esta terapia. Por essa razão, nosso grupo, busca compreender alguns mecanismos celulares responsáveis pela aquisição da radiorresistência.

Um estudo sobre o perfil de radiorresistência e moléculas relacionadas com esse fenômeno foi conduzido por um dos integrantes do nosso grupo (Bernardo PS), na linhagem de GB U251, durante o seu trabalho de dissertação de mestrado. Para uma melhor compreensão dos dados realizados pela autora da dissertação, trouxemos o resultado do acúmulo da fase sub-G0/G1 do ciclo celular, da linhagem U251 após exposição à radiação ionizante (Figura 5.0). Foi observado que apenas as doses de radiação acima de 8Gy, e após 24h, induziram aumento na fragmentação do DNA. Porcentagem de células em sub-G0/G1 de aproximadamente 20% foram encontrados nas doses de radiação de 8, 16 e 24 Gy em 48h, e de 45% nas doses de 8 e 16 Gy em 72h.

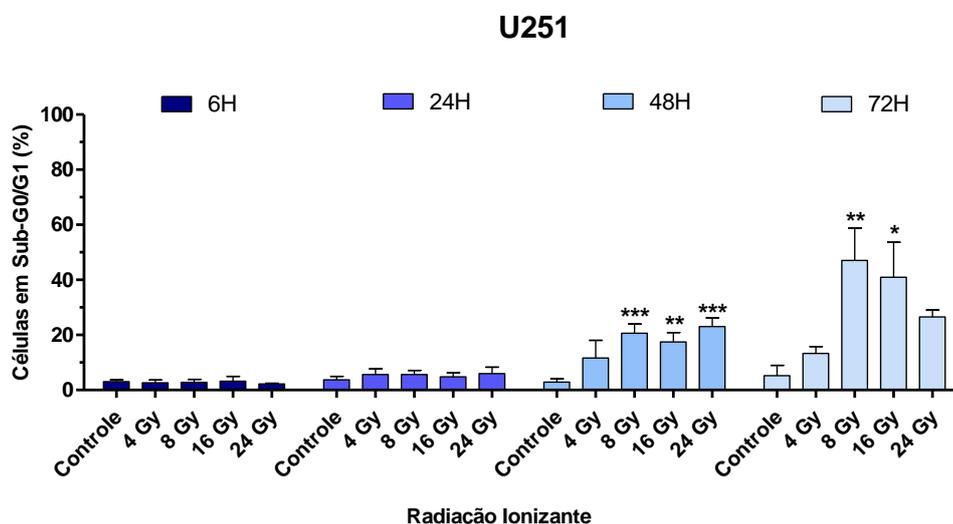


Figura 5.0. Fragmentação do DNA da linhagem U251 após exposição à radiação ionizante, analisada por citometria de fluxo. Porcentagem de células em sub-G0/G1 da linhagem U251 após exposição a diferentes doses de radiação ionizante por 6, 24, 48 e 72h. Média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao DMSO. Gráfico cedido por Bernardo P. S.

Com o objetivo de comparar as linhagens utilizadas no presente estudo quanto ao seu perfil de radiorresistência, este trabalho prosseguiu visando analisar a sensibilidade à radiação ionizante utilizando as linhagens de GB, T98G e A172. Para isso, contamos com o ensaio da progressão do ciclo celular e da fragmentação do DNA, analisado por citometria de fluxo. Além disso, foi dada continuidade ao estudo da avaliação das moléculas relacionadas com a aquisição de radiorresistência pela quantificação relativa dos níveis de microRNA-125b por qRT-PCR.

5.1.1) Alteração do perfil do ciclo celular e da fragmentação do DNA nas linhagens de GB expostas a radiação ionizante

Foram utilizadas as doses de radiação ionizante de 2, 4, 8, 16 e 24 Gy, para avaliar a mudança no perfil do ciclo celular e na fragmentação do DNA nas linhagens de GB, T98G e A172 (Figura 5.1 e 5.2).

Em ambas as linhagens, houve acúmulo das células na fase G2/M do ciclo celular, em todas as doses de radiação ionizante, em torno de 60% no tempo de 6h (Figura 5.1A e B). Entretanto, nas linhagens expostas as doses de radiação de 2 e 4 Gy, nos tempos de 24, 48 e 72h, o acúmulo na fase G2/M não persistiu (Figura 5.1A e B). A maior parada na fase G2/M do ciclo celular ocorreu nas doses de radiação de 16 e 24 Gy em, aproximadamente, 90% na linhagem T98G no tempo de 24 h (Figura 5.1A) e 70% na linhagem A172 nos tempos de 24, 48 e 72h (Figura 5.1B). Em tempos superiores a 24h, e nas doses de 16 e 24 Gy, o perfil do ciclo celular na linhagem T98G não apresentou uma definição característica desta técnica (Figura 5.1A).

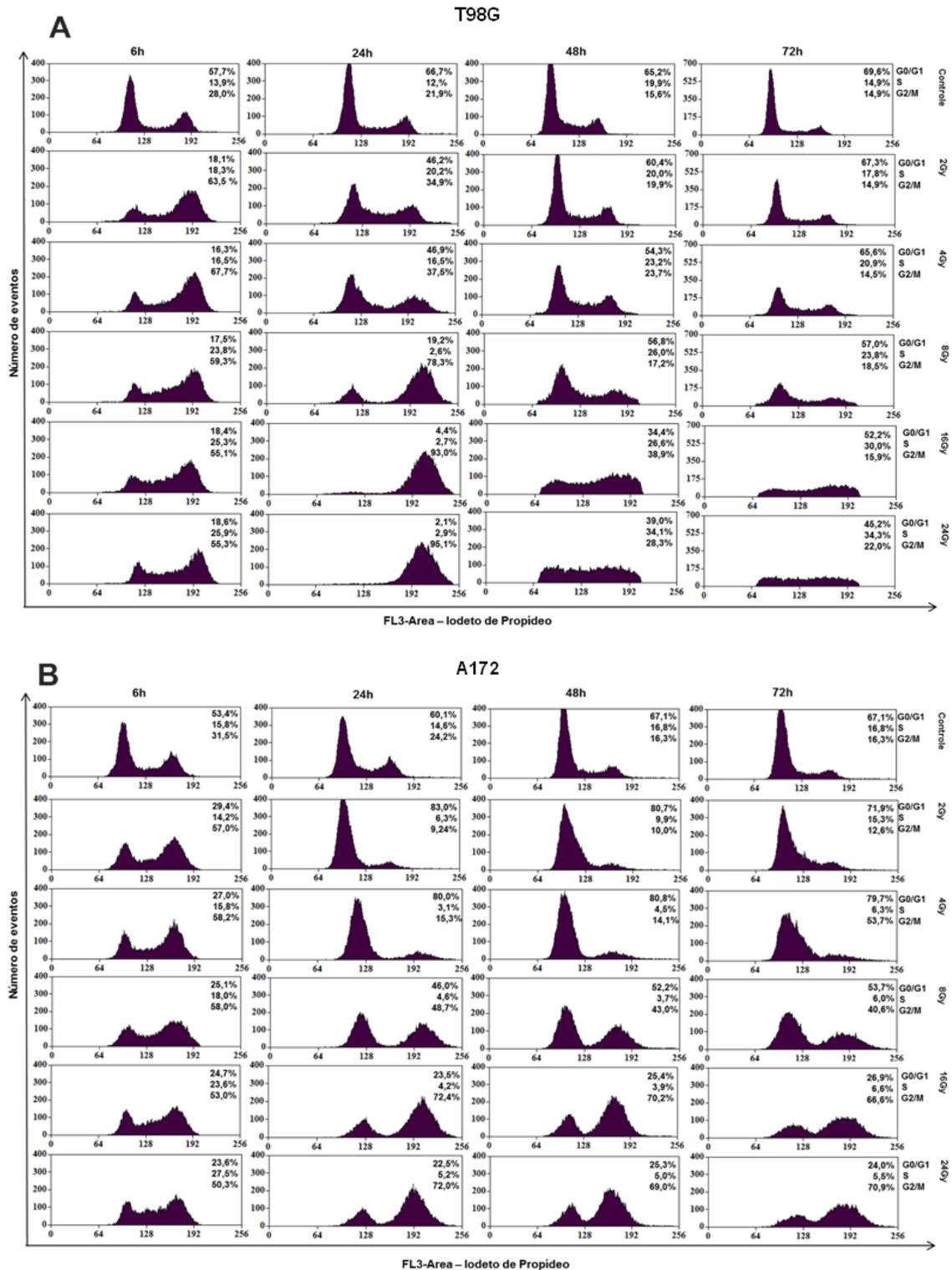


Figura 5.1. Histograma representativo do ensaio de ciclo celular das linhagens de glioblastoma T98G e A172 após exposição à radiação ionizante, avaliado por citometria de fluxo. A linhagem T98G (A) e a linhagem A172 (B) foram expostas a diferentes doses de radiação ionizante e incubadas por 6, 24, 48 e 72h. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

5.1.2) Modulação do microRNA-125b, na linhagem U251, após exposição a radiação ionizante

A desregulação dos microRNAs apresenta um importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer (DI LEVA. et al., 2014). Determinadas assinaturas de expressão dessas moléculas podem ser responsáveis pela aquisição de resistência à terapia nos gliomas (BESSE, et al., 2013). Por essa razão, torna-se importante avaliar a modulação dos microRNAs induzida por radiação ionizante, uma das terapias padrões do GB.

Algumas moléculas foram previamente avaliadas pela integrante do grupo, (Bernardo P. S), a fim de correlacionar com a aquisição da radiorresistencia. Dentre elas, destacamos a expressão relativa do microRNA-7 após exposição as doses de 8 e 16Gy de radiação ionizante na linhagem U251 em 24h. Como resultado, observamos que a dose de radiação de 8Gy não modulou a expressão relativa, enquanto a dose de 16Gy reduziu, de forma não significativa, para 0,65 vezes o nível de expressão relativa em relação ao controle.

No presente estudo, foi investigado a modulação da expressão relativa do microRNA-125b na linhagem de GB U251, exposta as doses de 8 e 16Gy após 24 e 48h por qRT-PCR. Houve uma tendência de aumento, de forma não significativa, em relação ao controle da expressão do microRNA-125b após exposição a radiação ionizante em 24h, com níveis aproximados de 3,3 vezes para 8Gy e 2,9 vezes para 16Gy (Figura 5.3). No tempo de 48 horas foi visto um perfil de diminuição, não significativo, de 0,8 vezes e 0,1 vezes nos níveis de expressão do microRNA-125b nas doses de 8 e 16Gy, respectivamente (Figura 5.3).

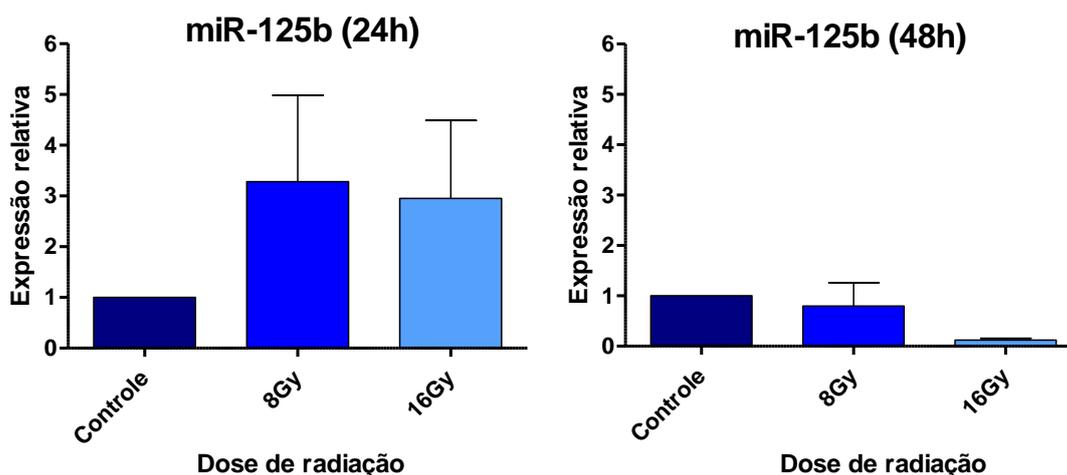


Figura 5.3. Quantificação relativa dos níveis de miR-125b, na linhagem U251 após exposição a radiação ionizante, avaliado por qRT-PCR. A expressão do miR-125b foi avaliada na linhagem U251, após exposição as doses de 8 e 16 Gy de radiação ionizante por 24 e 48h. Os níveis de expressão relativa do microRNA foram apresentados em número de vezes em relação ao controle. A expressão gênica foi normalizada pela expressão do snRNA endógeno RNU6B. Os valores representam a média de três experimentos independentes.

5.2) Novo composto sintético LQB-223: Avaliação do efeito antitumoral e do mecanismo de ação em linhagens de glioblastoma

O desenvolvimento de novas moléculas, com potencial antitumoral e com uma ampla modulação de vias intracelulares oncogênicas, é importante no contexto da quimiorresistência das neoplasias e, principalmente, no GB.

O presente estudo é uma continuação do trabalho desenvolvido durante a monografia de conclusão de curso. Verificamos na ocasião que o composto LQB-223 reduziu a porcentagem de células viáveis na linhagem de GB U251, após 72h de incubação, para 55,9% na concentração de 5 μ M ($p < 0,001$) e 48,5% em 10 μ M ($p < 0,001$) (Figura 5.4A).

Em seguida, foi observado que a concentração de 5,0 μ M do composto LQB-223 induziu aumento na fragmentação do DNA em todos os tempos analisados. Houve um acúmulo na porcentagem de células em Sub-G0/G1, de 32,7% ($p < 0,001$), 40,2% ($p < 0,001$) e 37,2% ($p < 0,01$), respectivamente, nos tempos de 24, 48 e 72h. A indução da fragmentação do DNA foi tempo dependente nas concentrações de 10 e

20 μ M do composto LQB-223. Observamos um aumento, estatisticamente significativo, da porcentagem de células em sub-G0/G1, de 26,4%, após o tratamento com 10 μ M de LQB-223 em 72 horas ($p < 0,05$) (Figura 5.4B).

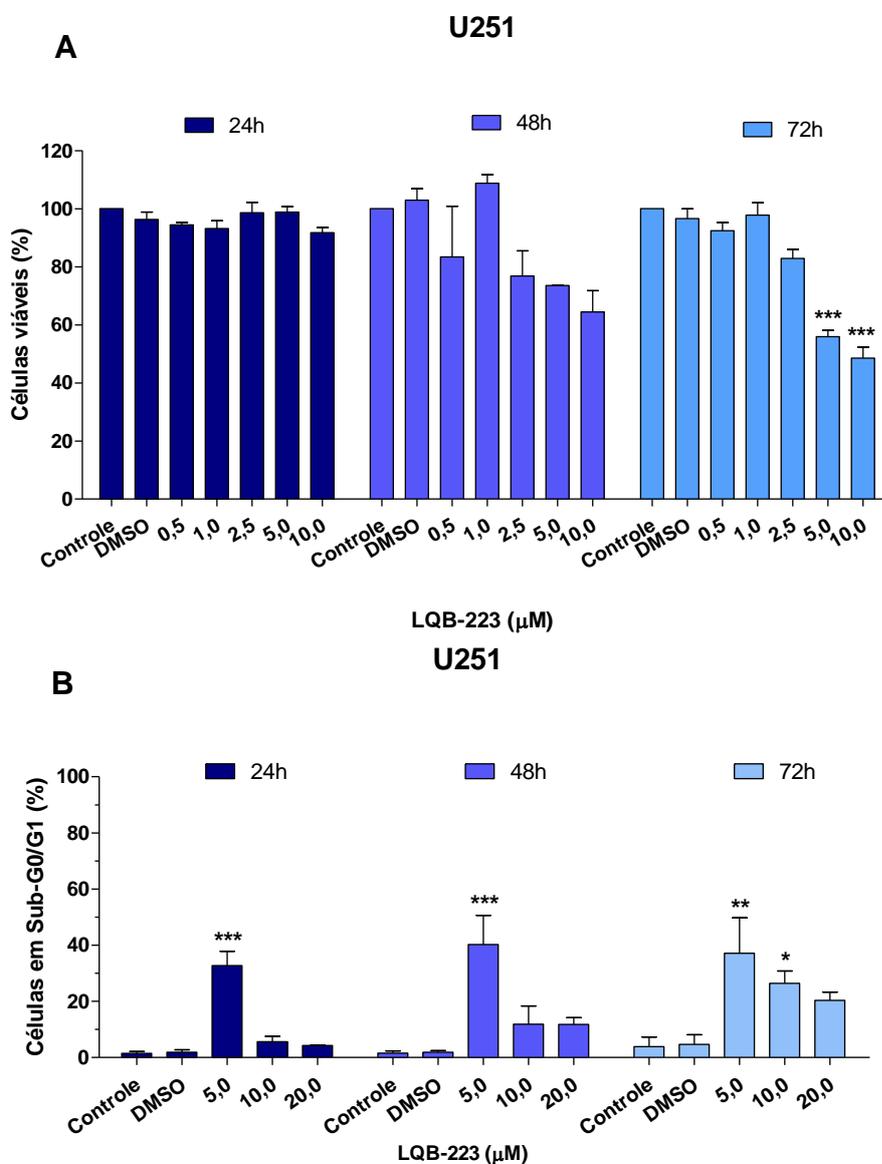


Figura 5.4. Resultados preliminares do efeito antitumoral do novo composto sintético LQB-223, na linhagem U251. Diferentes concentrações do LQB-223 foram utilizadas após os tempos de incubação de 24, 48 e 72h. Foi avaliada a viabilidade celular (A), a fragmentação do DNA (B) e a morte celular por apoptose, representada pela média das células anexinaV⁺ (C) e pelo histograma de um dos experimentos (D). Média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao DMSO. O Histograma contém a porcentagem das células vivas (anexina V-/PI-), em apoptose inicial (anexina V+/PI-), em apoptose tardia (anexina V+/PI+) e em necrose (anexina V-/PI+). Resultados gerados durante a monografia de conclusão de curso.

O composto LQB-223 induziu um aumento significativo na porcentagem de células anexina V⁺, indicativo de morte celular por apoptose, nas três concentrações utilizadas, após 48 e 72h de incubação. A porcentagem de células anexina V⁺ após 48h de incubação com o LQB-223 foi de 17,6% em 5μM ($p<0,05$), 17,7% em 10μM ($p<0,05$) e de 22,5% em 20μM ($p<0,05$). Em 72h de incubação, observamos porcentagens de 24,2% em 5μM ($p<0,001$), 24,9% em 10μM ($p<0,001$) e 20,7% em 20μM ($p<0,05$). (Figura 5.4C). Pelo histograma representativo dos experimentos é possível notar que o aumento nas células anexina V⁺ após a incubação com o composto, levou a indução de apoptose tardia (Figura 5.4D).

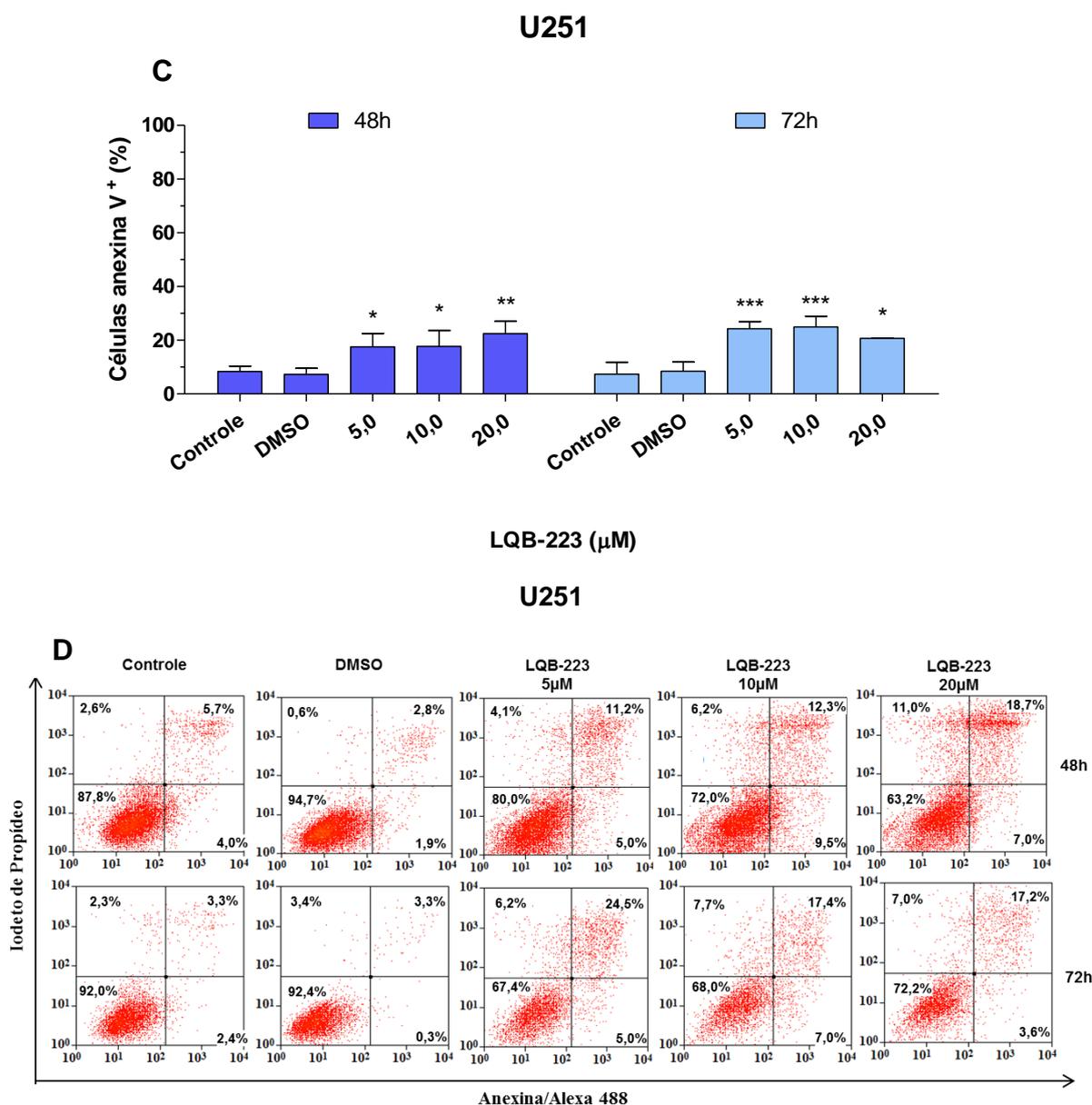


Figura 5.4. Resultados preliminares do efeito antitumoral do novo composto sintético LQB-223, na linhagem U251. (Continuação da figura 5.4)

Com base nos resultados iniciais foi dado prosseguimento ao estudo com o novo composto, LQB-223, gerando parte do trabalho da presente dissertação de mestrado. Avançamos nos experimentos com a linhagem U251 e inserimos duas novas linhagens de GB, buscando um melhor entendimento do potencial antitumoral e mecanismo de ação do composto LQB-223.

5.2.1) O LQB-223 modifica a morfologia celular das linhagens de GB

Com o intuito de observar se haveria modificação na morfologia celular das linhagens de GB após a incubação com o composto LQB-223, fotomicrografias foram retiradas por um microscópio óptico, em diferentes tempos de incubação e concentração do composto (Figura 5.5). Verificamos que o composto LQB-223, em ambas as concentrações e tempos avaliados, induziu uma diminuição na densidade celular, bem como um aumento do número de células não aderidas ao substrato da garrafa e de formato arredondado, nas linhagens U251 (Figura 5.5A), T98G (Figura 5.5B) e A172 (Figura 5.5C). Tal fenômeno é indicativo de morte celular.

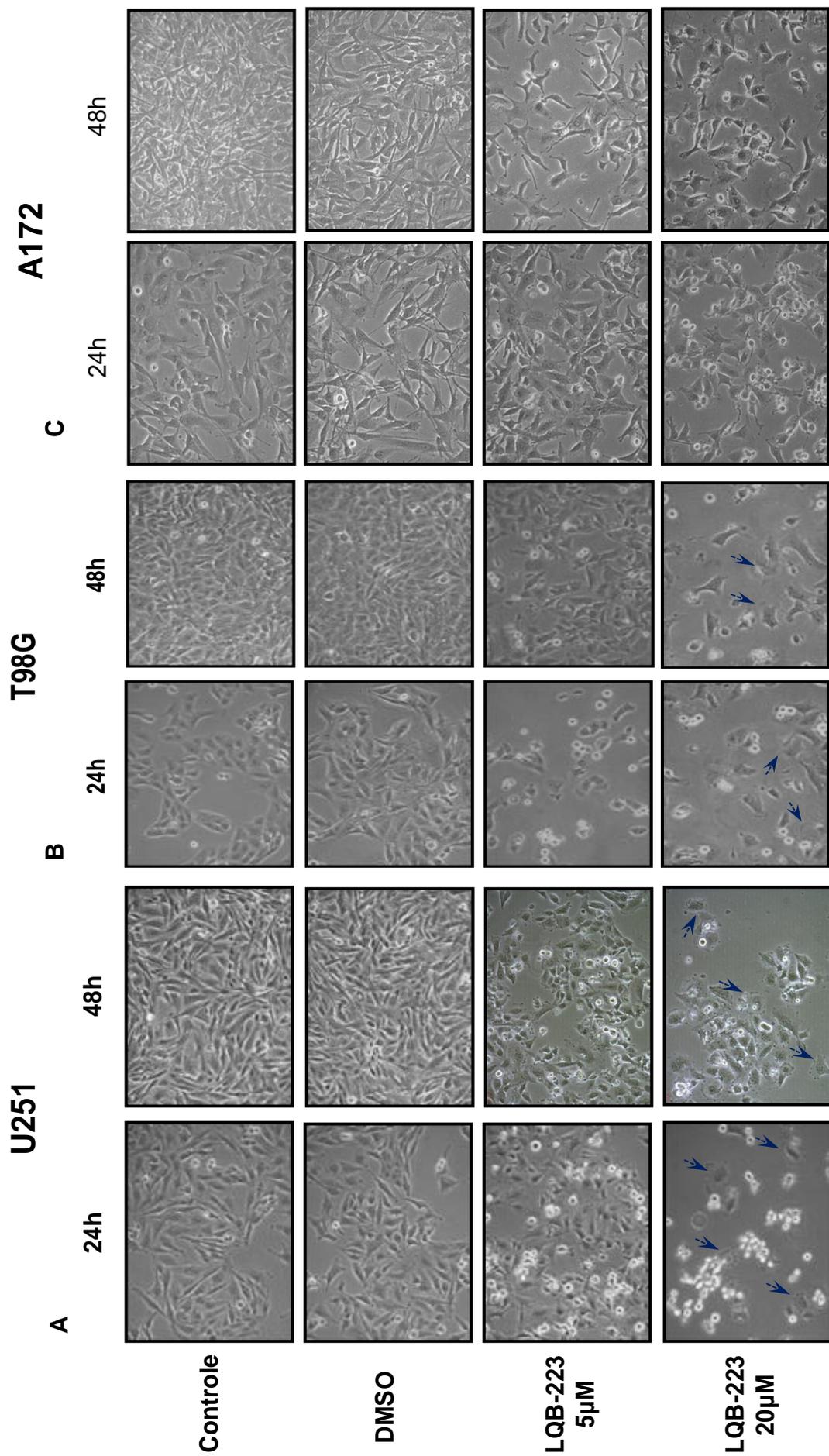


Figura 5.5. Morfologia celular das linhagens de glioblastoma U251, T98G e A172 após incubação com o novo composto LQB-223, obtida por microscópio óptico. Morfologia celular da linhagem U251 (A), T98G (B) e A172 (C) após incubação com as concentrações de 5 e 20µM de LQB-223, por 24 e 48h. Setas azuis indicam células com mudança na morfologia. Imagem representativa, no aumento de 10X, de dois experimentos independentes.

5.2.2) O composto LQB-223 reduz a viabilidade celular das linhagens de GB

A fim de avaliar o potencial de redução da viabilidade celular nas linhagens celulares, T98G e A172, induzida pelo composto LQB-223, foi realizado o teste de viabilidade celular por MTT (Figura 5.6). O composto foi incubado durante 24, 48 e 72h nas concentrações de 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e 20 μ M. O composto LQB-223 reduziu a viabilidade celular em ambas as linhagens tumorais no tempo de 72h. Verificamos as seguintes porcentagens de células viáveis na linhagem T98G: 65,1% em 5 μ M ($p < 0,001$), 44,2% em 10 μ M ($p < 0,001$) e 46,3% em 20 μ M ($p < 0,001$) (Figura 5.6A). Por outro lado, na linhagem A172 a redução da viabilidade celular ocorreu em menores níveis, com porcentagens de células viáveis de 63,9% em 10 μ M ($p < 0,05$) e 62,2% em 20 μ M ($p < 0,01$) (Figura 5.6B). A linhagem T98G foi mais sensível ao tratamento quando comparada com a linhagem A172, visto que apresentou reduções de células viáveis mais pronunciadas.

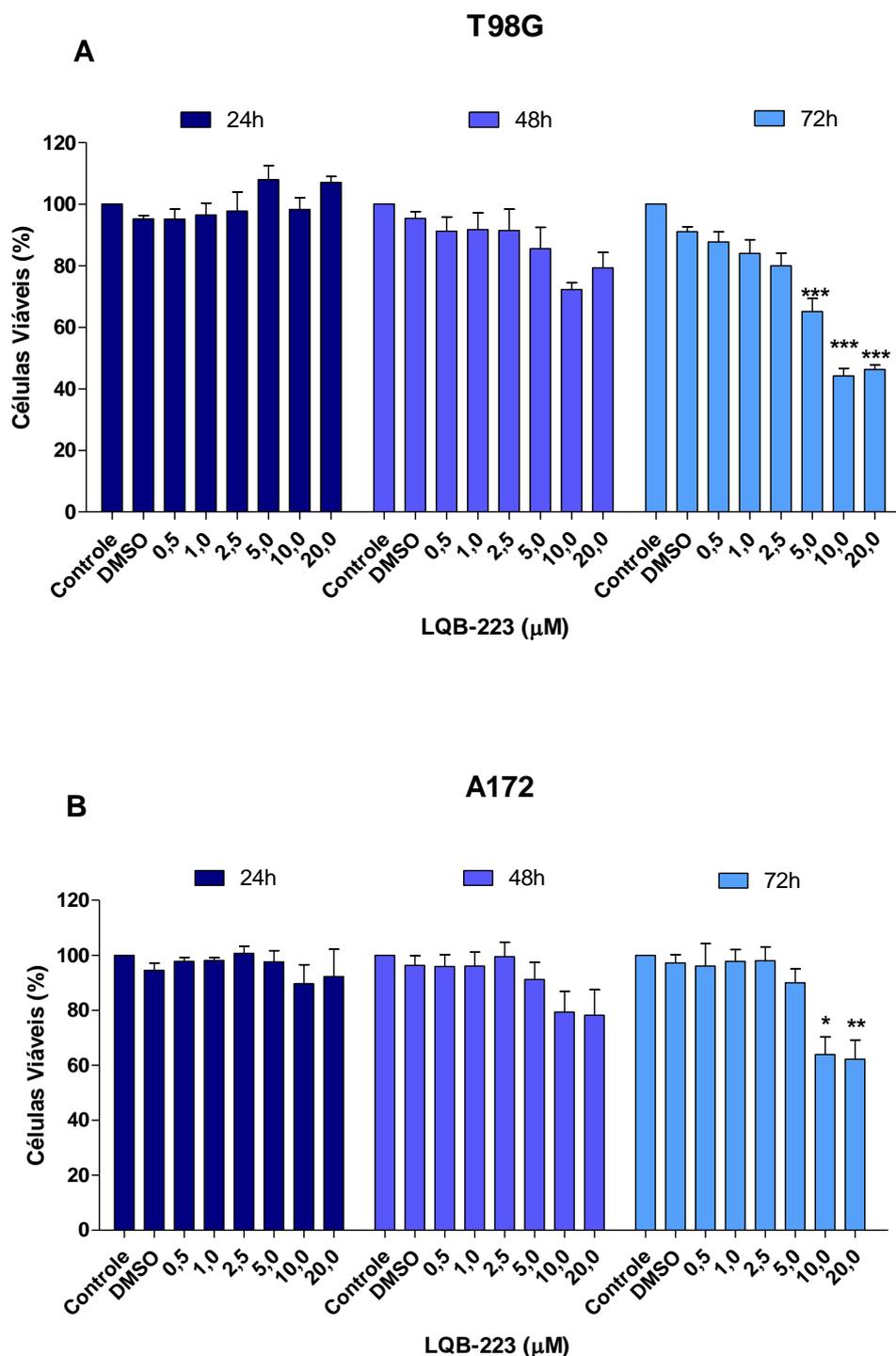


Figura 5.6. Viabilidade celular das linhagens T98G e A172 após incubação com o novo composto LQB-223, avaliada pelo ensaio de MTT. Porcentagem de células viáveis da linhagem T98G (A) e A172 (B) após incubação com diferentes concentrações do LQB-223 por 24, 48 e 72h. Média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ em relação ao DMSO.**

5.2.3) O composto LQB-223 diminui a formação de colônias das linhagens de GB

Dando prosseguimento ao estudo do efeito antitumoral do novo composto, realizamos o experimento de formação de colônias pelo ensaio clonogênico (Figura 5.7). Incubamos as linhagens com 2,5; 5; 10 e 20 μ M de LQB-223 por 24h, e após aguardar o crescimento das colônias as placas coradas com cristal violeta foram fotografadas. Observamos que o composto reduziu a formação de colônias em todas as concentrações testadas, tanto na linhagem U251 (Figura 5.7A) quanto na T98G (Figura 5.7B). As colônias diluídas e quantificadas em espectrofotômetro corroboraram os resultados das placas fotografadas. Com redução na formação de colônias (níveis de viabilidade celular relativa), em relação ao controle (1,0), de 0,6 em 5 μ M, 0,3 em 10 μ M e 0,2 em 20 μ M, na linhagem U251 (Figura 5.7A). O mesmo foi observado na linhagem T98G, com níveis de viabilidade celular relativa de 0,3 em 5 μ M, 0,1 em 10 μ M e 0,1 em 20 μ M (Figura 5.7B). Os dados obtidos sugerem que o composto inibe proliferação nas linhagens de GB.

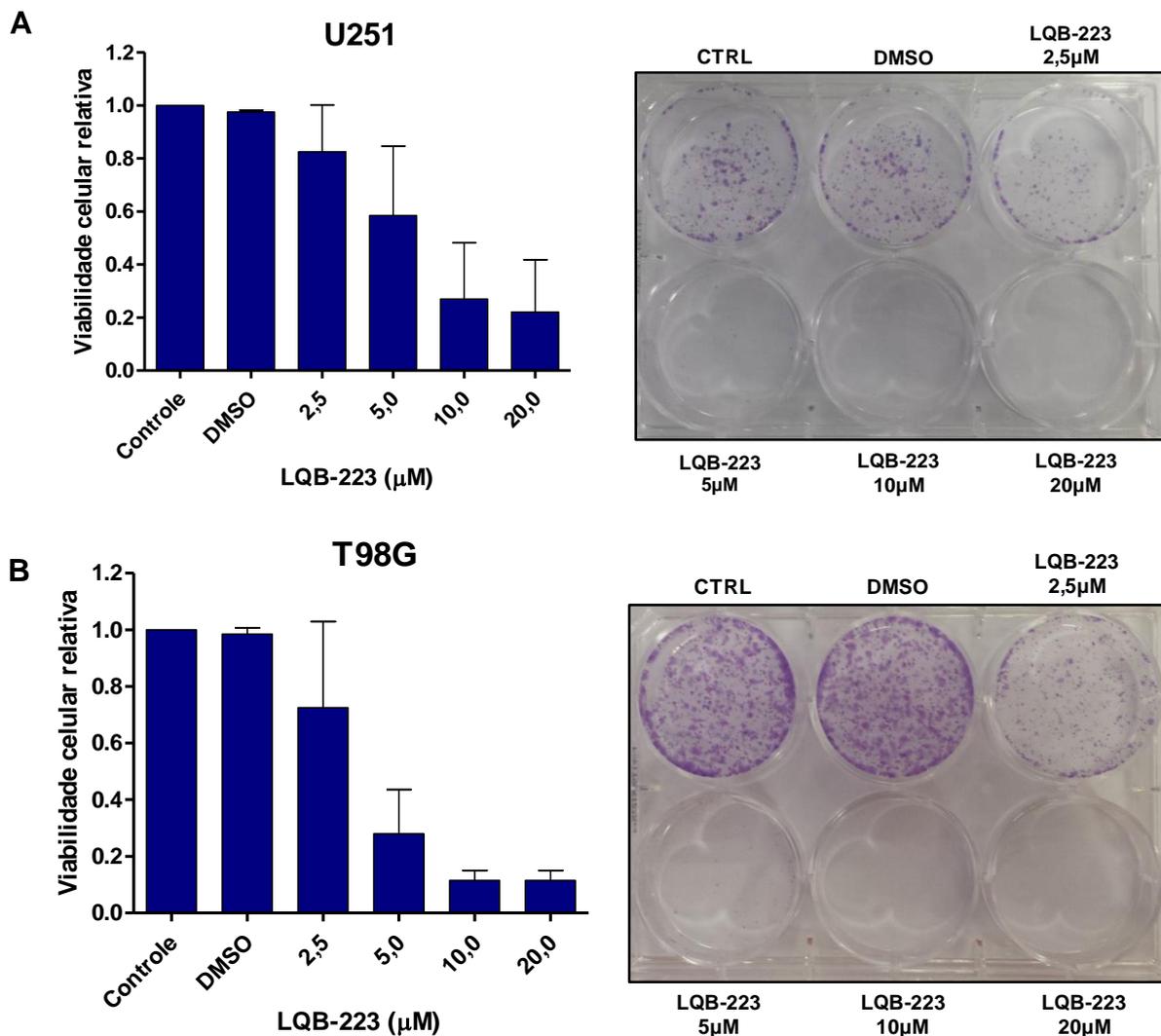


Figura 5.7. Ensaio clonogênico de formação de colônias da linhagem U251 e T98G após a incubação com o novo composto sintético LQB-223. Diferentes concentrações de LQB-223 foram incubadas durante 48h e o meio trocado após esse período. Colônias formadas após o tempo determinado foram coradas com cristal violeta e fotografadas, além de serem diluídas e quantificadas em espectrofotômetro, na linhagem U251 (A) e T98G (B). Imagens representativas de dois experimentos independentes.

5.2.4) O novo composto LQB-223 altera o perfil do ciclo celular nas linhagens de GB

Com o propósito de melhor caracterizar os efeitos citotóxicos induzidos pelo composto LQB-223, analisamos o conteúdo de DNA de cada fase do ciclo celular pela marcação com iodeto de propídeo e leitura em citômetro de fluxo. Foram

utilizadas as concentrações de 5, 10 e 20 μM de LQB-223 incubadas durante os tempos de 24, 48 e 72h. (Figura 5.8 e 5.9).

O tempo de incubação de 24h foi utilizado nas análises do perfil do ciclo celular (Figura 5.8). Foi observado um acúmulo na porcentagem de células na fase G2/M do ciclo celular de aproximadamente 75%, após a incubação com as concentrações de 10 e 20 μM de LQB-223 nas linhagens T98G e A172 (Figura 5.8). O mesmo perfil não foi observado nas linhagens incubadas com 5 μM do composto (Figura 5.8).

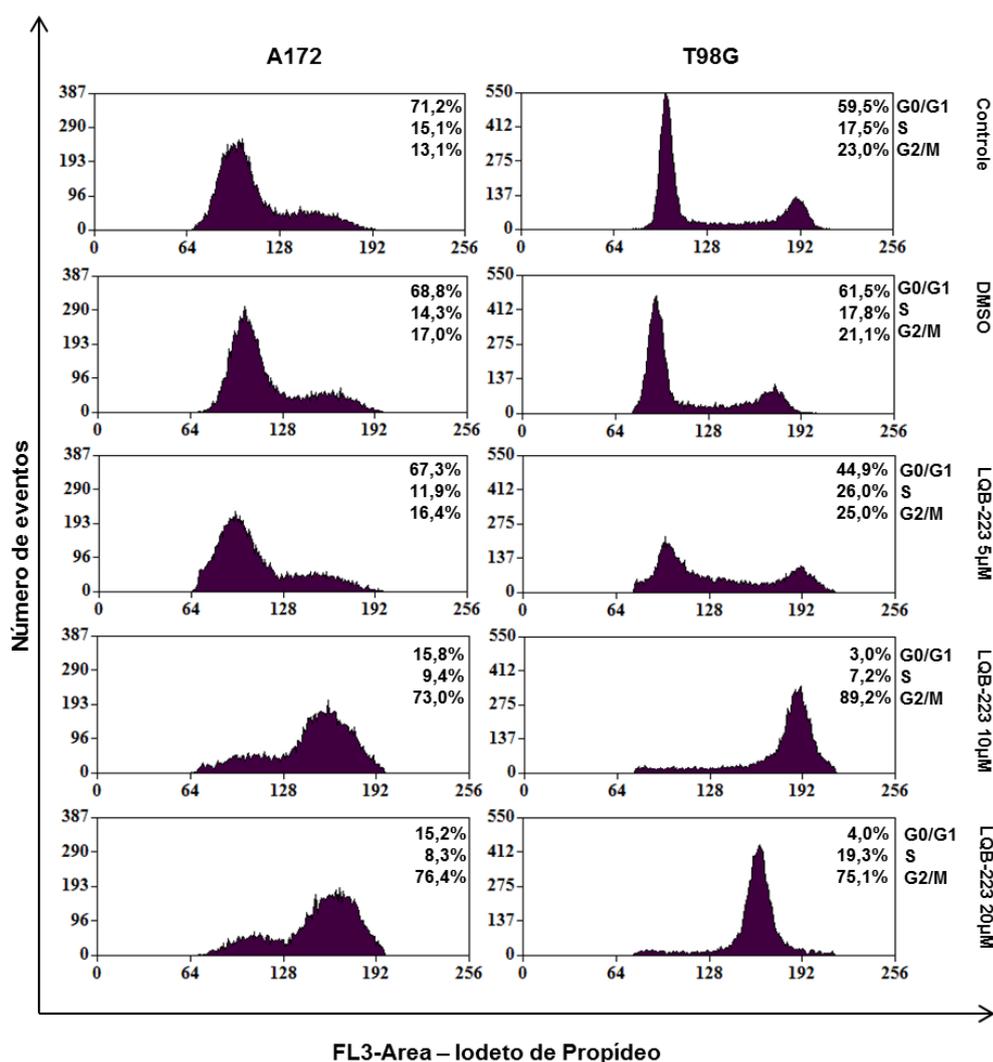


Figura 5.8. Histograma representativo do ensaio de ciclo celular das linhagens T98G e A172 após incubação com o novo composto LQB-223, avaliado por citometria de fluxo. As linhagens T98G e A172 foram expostas as concentrações de 5, 10 e 20 μM de LQB-223 por 24h e analisadas quanto ao conteúdo de DNA por citometria de fluxo. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

O ensaio da fragmentação do DNA quantifica por citometria de fluxo o número de células com o DNA fragmentado, através da mensuração das células em sub-G0/G1. Para esta análise utilizamos os tempos de incubação de 24, 48 e 72h. (Figura 5.9).

Observamos que na linhagem T98G a concentração de 5 μM do composto induziu fragmentação do DNA nos três tempos de incubação analisados, com porcentagens de 26,5% em 24h ($p<0,001$), 39,9% em 48h ($p<0,001$) e 37,9% em 72h ($p<0,001$). As concentrações mais elevadas de LQB-223, 10 e 20 μM , promoveram os maiores valores de fragmentação do DNA em 72h, com taxas de 37,7% em 10 μM ($p<0,001$) e 32,9% em 20 μM ($p<0,01$). Nessas concentrações a indução de fragmentação parece ser tempo-dependente. (Figura 5.9A).

A indução de fragmentação do DNA na linhagem A172 não seguiu o mesmo perfil observado na U251 (Figura 5.4C) e na T98G (Figura 5.9A). As concentrações de 5 e 10 μM de LQB-223 induziram aumento na fragmentação do DNA nos três tempos analisados (Figura 5.9B). Entretanto, o aumento estatisticamente significativo nas células em sub-G0/G1, ocorreu somente na concentração de 10 μM com as taxas de 15,4% em 24h ($p<0,05$), 26,1% em 48h ($p<0,05$) e 20,7% em 72h ($p<0,05$) (Figura 5.9B). Levando-se em consideração a técnica descrita, verificamos que a linhagem A172 foi a menos sensível entre as três linhagens estudadas.

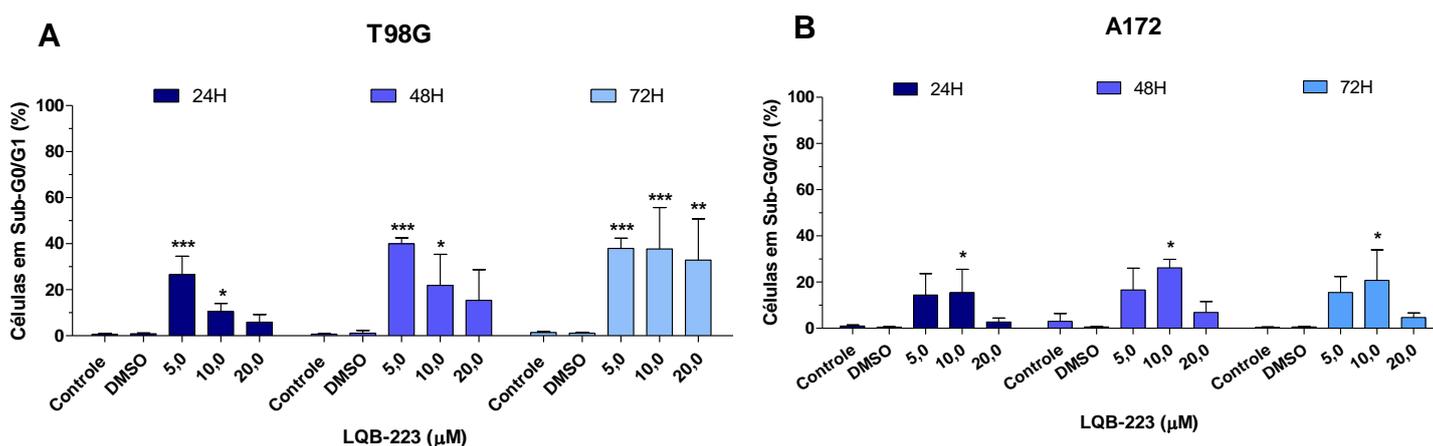


Figura 5.9. Fragmentação do DNA da linhagem T98G e A172 após incubação com o novo composto LQB-223, avaliada por citometria de fluxo. Porcentagem de células em sub-G0/G1 da linhagem T98G (A) e A172 (B) após a incubação com diferentes concentrações do LQB-223 por 24, 48 e 72h. Média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ em relação ao DMSO.

5.2.5) O composto LQB-223 induz morte celular por apoptose nas linhagens de GB.

Tendo em vista que o LQB-223 diminui a viabilidade celular, induz fragmentação do DNA e acúmulo de células na fase G2/M do ciclo celular, prosseguimos com o ensaio de anexina V/PI, avaliado por citometria de fluxo, a fim de verificar uma possível morte celular por apoptose induzida pelo composto. A linhagem A172 foi incubada com as concentrações de 5, 10 e 20 μM de LQB-223, nos tempos de 48 e 72h. Consideramos um indicativo de morte celular por apoptose o cálculo das células anexinaV⁺, sendo a soma da apoptose inicial (anexina V⁺/PI⁻) com a apoptose tardia (anexina V⁺/PI⁺). (Figura 5.10).

O cálculo da positividade das células anexina V, demonstrou que o composto induz morte celular por apoptose na linhagem A172 (Figura 5.10A). Foi observado um aumento estatisticamente significativo das células anexina V⁺ de 18% na concentração de 20 μM de LQB-223, em 24h ($p < 0,05$) (Figura 5.10A). O histograma representativo dos experimentos retrata o número de células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia, e em necrose (Figura 5.10B). Essa análise permite inferir que o composto induz preferencialmente apoptose tardia, na linhagem A172 e nos tempos estudados (Figura 5.10B), em concordância com a alteração observada na linhagem U251 (Figura 5.4D).

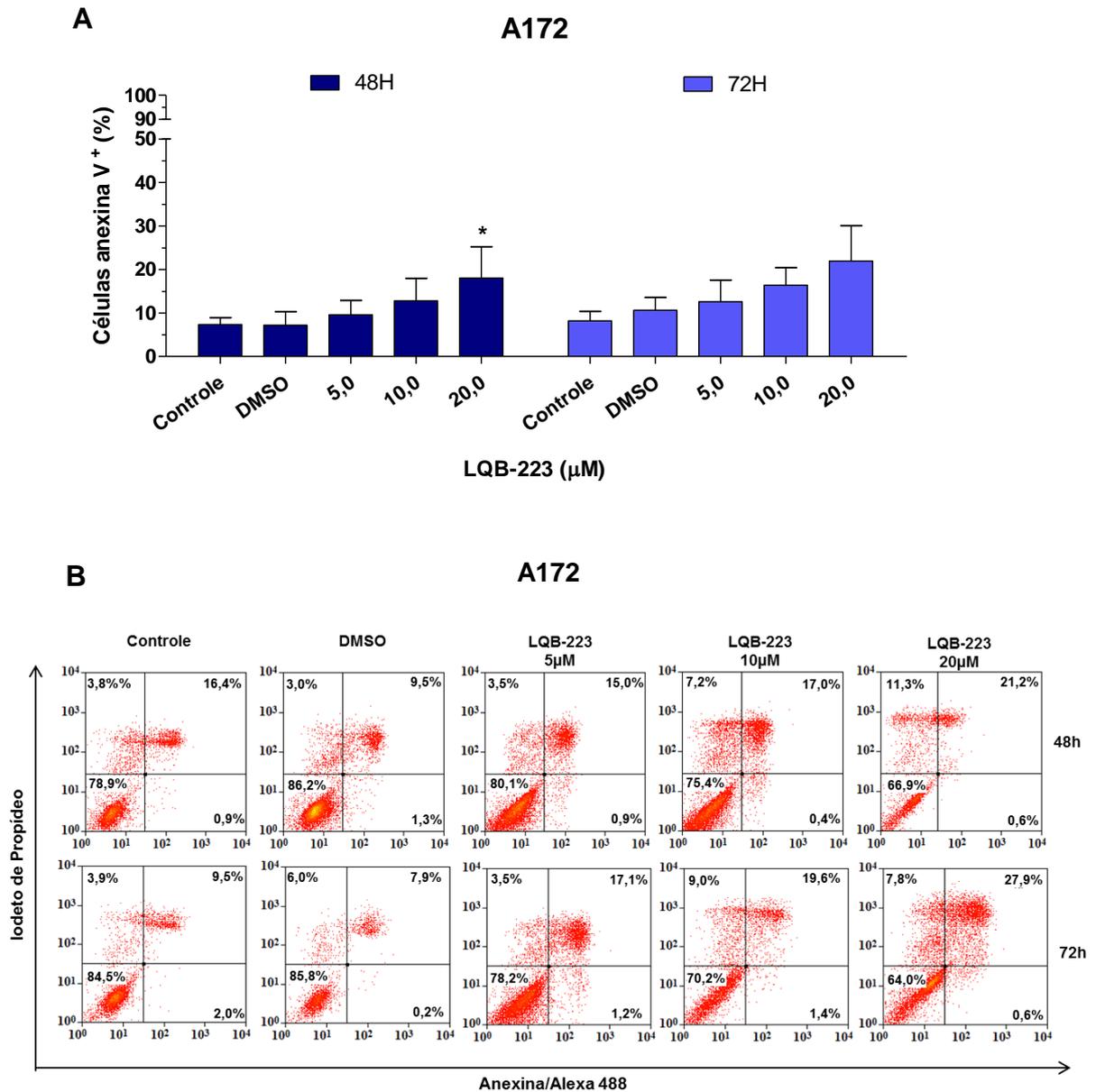


Figura 5.10. Morte celular por apoptose da linhagem A172 após incubação com o composto LQB-223, avaliada por citometria de fluxo. A linhagem A172 foi incubada com diferentes concentrações de LQB-223, por 48 e 72h, e avaliada quanto a indução de apoptose pela marcação de anexinaV/PI em citômetro de fluxo. Representamos a indução de apoptose pela média das células anexinaV⁺ (A) e pelo histograma de um dos experimentos (B). Células anexina V⁺ = apoptose inicial (anexina V⁺/PI⁻) + apoptose tardia (anexina V⁺/PI⁺). Média de três experimentos independentes ± desvio padrão. **p*<0,05 em relação ao DMSO. O histograma contém a porcentagem das células vivas (anexina V⁻/PI⁻), em apoptose inicial (anexina V⁺/PI⁻), em apoptose tardia (anexina V⁺/PI⁺) e em necrose (anexina V⁻/PI⁺).

Considerando que somente a marcação da exposição de fosfatidilserina não é suficiente para afirmar que as células se encontram em morte celular por apoptose, avaliamos a ativação da proteína caspase-3 por WB, após a incubação com 5 e 20 μ M de LQB-223 em 24h, na linhagem U251 (Figura 5.11). A caspase-3 é caracterizada como uma das proteínas efetoras da apoptose por clivar diversos substratos e ser uma das responsáveis pela iniciação das alterações fenotípicas desse evento. Essa proteína é ativada pela clivagem da sua forma inativa (procaspase-3), elevando os níveis da sua forma ativa (caspase-3 clivada). Dessa forma, confirmamos que o LQB-223 induz morte celular por apoptose na linhagem U251, uma vez que houve diminuição dos níveis proteicos da procaspase-3 e aumento da caspase-3 clivada, em ambas as concentrações testadas (Figura 5.11).

U251

24h

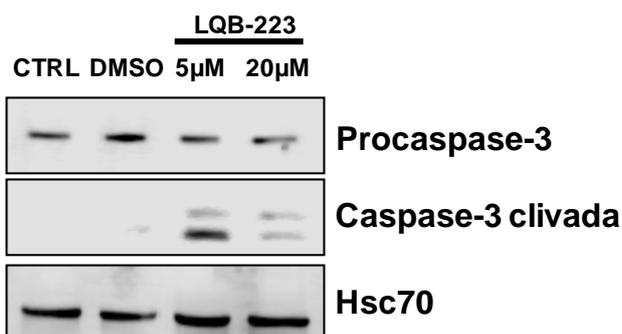


Figura 5.11. Ativação da proteína caspase-3 na linhagem U251 após incubação com o composto LQB-223, avaliado por WB. A expressão da proteína procaspase-3 e caspase-3 clivada foi avaliada pela técnica de WB após a incubação com 5 e 20 μ M de LQB-223, no tempo de 24h. A expressão da proteína Hsc70 foi utilizada como controle endógeno. Figura representativa de dois experimentos independentes.

5.2.6) O composto LQB-223 aumenta a fosforilação da histona H2AX na linhagem T98G

Com o objetivo de avançar na caracterização e no entendimento dos eventos iniciados pelo composto LQB-223 nas linhagens tumorais, avaliamos a fosforilação

da histona H2AX na linhagem T98G após a incubação com 5 e 20 μM de LQB-223 em 24 e 48h (Figura 5.12).

Algumas terapias utilizadas para o tratamento do câncer induzem a quebra da dupla fita do DNA, como a radiação ionizante. A fosforilação da proteína H2AX é um dos eventos iniciais após a quebra da dupla fita do DNA, sendo responsável pela amplificação do dano e pelo recrutamento de proteínas de reparo para a área da lesão (ROGAKOU, et al., 1999 ; TURINETTO e GIACHINO, 2015).

O composto LQB-223 induziu aumento na fosforilação da histona H2AX nos tempos de 24 e 48h, e em ambas as concentrações utilizadas (Figura 5.12). O resultado demonstra que as alterações fenotípicas observadas nas linhagens de GB incubadas com o LQB-223, podem ter sido desencadeadas após a quebra da dupla fita do DNA.

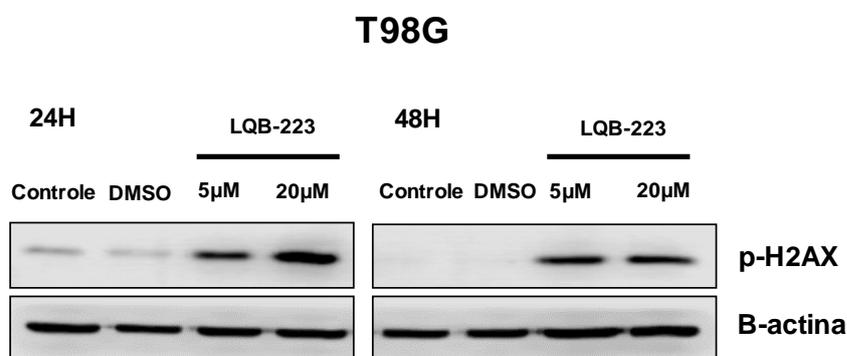


Figura 5.12. Aumento da p-H2AX na linhagem T98G após incubação com o novo composto sintético LQB-223, avaliado por WB. A fosforilação da histona H2AX foi avaliada pela técnica de WB após a incubação com 5 e 20 μM de LQB-223, no tempo de 24 e 48h. A expressão de β -actina foi utilizada como controle endógeno. Figura representativa de três experimentos independentes.

5.2.7) O composto LQB-223 modula a via das MAP kinases ERK1/ERK2 em linhagens de GB

A resistência ao tratamento no GB pode ser parcialmente explicada pela desregulação da via dos fatores de crescimento, como a amplificação e a mutação em genes dos RTKs. Cerca de 50% dos pacientes com GB apresentam mutação e amplificação em RTKs, como o EGFR (Receptor de fator de crescimento epidermal)

(Cancer Genome Atlas Research, 2008). Nessas condições, as vias associadas aos RTKs encontram-se mais ativas, como a via das MAP kinases ERK1/ERK2, resultando, por exemplo, em uma maior proliferação nas células transformadas.

Com o objetivo de progredir no entendimento do mecanismo de ação do LQB-223, avaliamos a capacidade de modulação do composto de uma importante via desregulada em células de GB, a via das MAP kinases ERK1/ERK2. Para isso, analisamos a expressão de algumas proteínas integrantes dessa via por WB, nas linhagens U251 e T98G, após a incubação com 5 e 20 μ M de LQB-223 nos tempos de 24 e 48h (Figura 5.13).

Verificamos que houve uma diminuição pronunciada nos níveis de fosforilação da proteína ERK na linhagem U251 (Figura 5.13A) e na T98G (Figura 5.13B), em ambas as concentrações e tempos avaliados. Não foi observada alteração da forma total da proteína ERK na linhagem U251 (Figura 5.13A). Entretanto, houve redução da sua expressão na concentração de 20 μ M em 48h, na linhagem T98G (Figura 5.13B).

A proteína Ras também foi avaliada no estudo. A Ras é uma GTPase que na sua forma ativa está ligada ao GTP (Guanosina trifosfato), e uma de suas funções é fosforilar a proteína Raf, induzindo a ativação da via Raf/MEK/ERK. Mutações no gene de RAS são encontradas em 25% dos cânceres humanos e muitos esforços foram e são empregados na descoberta e no estudo de moduladores dessa proteína (RYAN, et al., 2015). Dessa maneira, procuramos verificar se o LQB-223 modularia a expressão da proteína Ras na linhagem U251, incubada com as concentrações de 5 e 20 μ M durante 24 e 48h. Foi observada uma diminuição nos níveis da proteína Ras em ambas as concentrações e tempos analisados (Figura 5.13A).

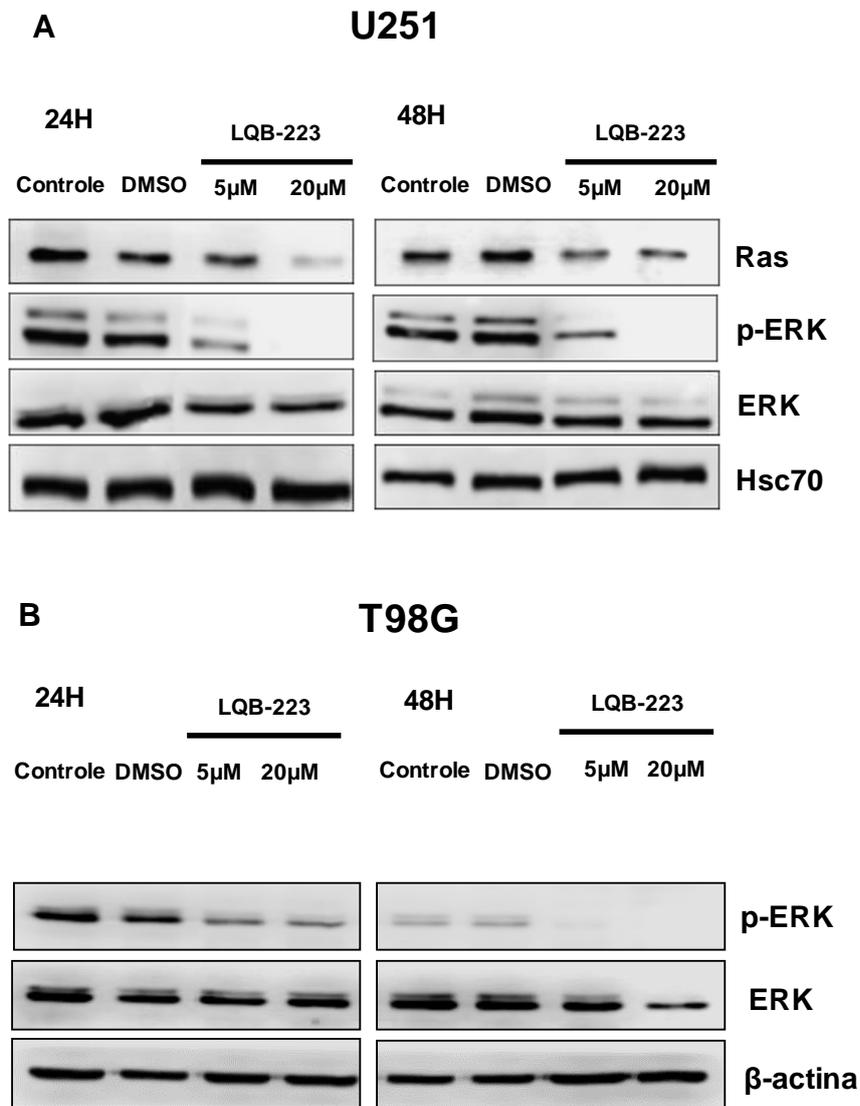


Figura 5.13. Modulação da via das MAP kinases ERK1/ERK2 nas linhagens U251 e T98G após incubação com o novo composto sintético LQB-223, avaliado por WB. A expressão da proteína Ras, ERK e p-ERK foi avaliada pela técnica de WB após incubação com 5 e 20 μ M de LQB-223, por 24 e 48h, na linhagem U251 (A) e T98G (B). A expressão de Hsc70 e β -actina foram utilizadas como controle endógeno. Figura representativa de três experimentos independentes.

5.2.8) O composto LQB-223 altera o perfil de expressão do microRNA-7

Os microRNAs podem estar diferencialmente expressos nas linhagens de GB, podendo influenciar a sensibilidade ou a resistência a terapia (BESSE, et al., 2013). Um novo composto que apresente o potencial de modular a expressão dos microRNAs, a fim de gerar uma sensibilidade das células à terapia padrão, ou até

mesmo ao seu efeito, torna-se relevante. Por essa razão, avaliamos a expressão relativa dos microRNA-7 e -125b na linhagem U251, e do microRNA-7 nas linhagens T98G e A172 pelo método de qRT-PCR após a incubação de 5 e 20 μ M de LQB-223 por 24h (Figura 5.14).

Na linhagem U251, as concentrações de 5 e 20 μ M de LQB-223, incubadas durante 24h, modularam a expressão relativa do microRNA-7 (Figura 5.14A). Nessa linhagem, o nível de expressão relativa do microRNA-7 aumentou em 2,9 e 5 vezes ($p < 0,01$) em relação ao controle, respectivamente, nas concentrações de 5 e 20 μ M ($p < 0,01$) de LQB-223 (Figura 5.14A). Em relação ao microRNA-125b, houve um aumento em sua expressão relativa de 1,8 e 2,4 vezes de forma não significativa, após a incubação com 5 e 20 μ M de LQB-223, respectivamente (Figura 5.14A).

Como citado anteriormente, o novo composto diminui a ativação da via das MAP kinases ERK1/ERK2 na linhagem U251 e T98G e levou a um aumento nos níveis de expressão do microRNA-7 na linhagem U251. Esse microRNA é um regulador negativo da via das MAP kinases ERK1/ERK2, por inibir a expressão do mRNA de EGFR e da proteína Raf1 (KEFAS, et al., 2008 ; WEBSTER, et al., 2009). Com o propósito de melhor compreender o mecanismo de ação do LQB-223 e com o respaldo da literatura de que o aumento do microRNA-7 pode ser o responsável pela regulação da via Raf/MEK/ERK, expandimos a análise de sua expressão para as outras linhagens de GB (Figura 5.14B e Figura 5.14C).

Um aumento, não significativo, nos níveis de expressão relativa do microRNA-7 de 2,5 e 2,3 vezes foi observado na linhagem T98G após a incubação com 5 e 20 μ M, respectivamente, de LQB-223 em 24h (Figura 5.14B). Na linhagem A172 não houve modulação nos níveis de expressão do microRNA-7 em todas as condições analisadas (Figura 5.14C). A presença do aumento nos níveis de expressão do microRNA-7 na linhagem T98G, reforça a participação dessa molécula no mecanismo de ação do LQB-223.

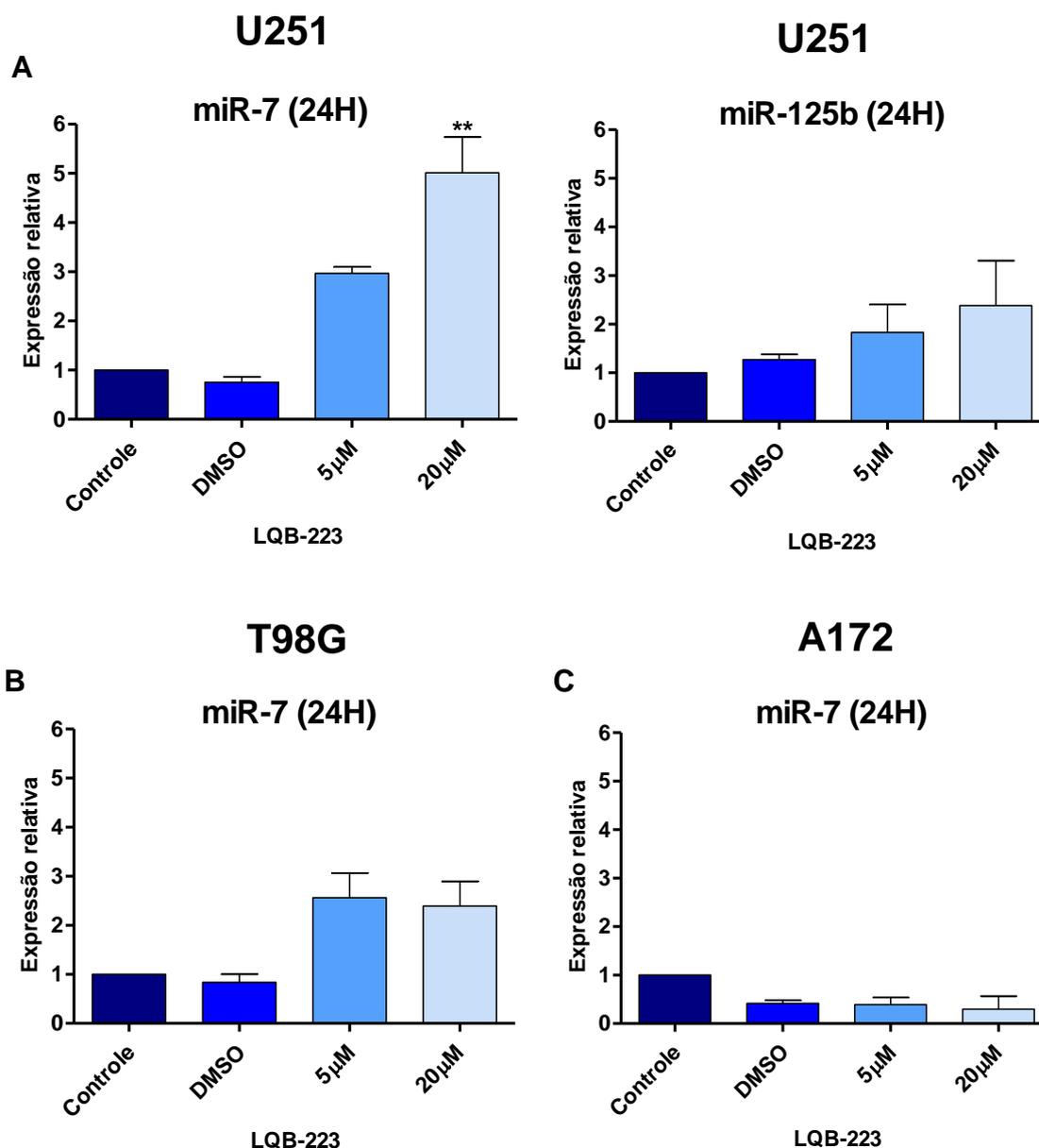


Figura 5.14. Quantificação relativa dos níveis de microRNA, nas linhagens de GB U251, T98G e A172 após incubação com o novo composto sintético LQB-223, avaliado por qRT-PCR. A expressão relativa do microRNA-7 e do -125b foi avaliada na linhagem U251 (A) e a do microRNA-7 na linhagem T98G (B) e A172 (C), após incubação com 5 e 20 μM de LQB-223 por 24h. Os níveis de expressão relativa

6) DISCUSSÃO

O GB é o subtipo mais comum entre os gliomas, representando 55,1% do total dos gliomas diagnosticados, e o subtipo mais maligno dentre os tumores do SNC (OSTROM, et al., 2015). Pacientes com esse tumor evoluem para o óbito, em média, 12 meses após o diagnóstico independente do protocolo terapêutico utilizado. Tal fato ocorre, principalmente, pela alta taxa de resistência a terapia. Estudos genômicos de larga escala, demonstram altas taxas de mutação e amplificação nos genes participantes da via de RTK/Ras/Raf/MEK/ERK1/2 nesse tumor (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK., 2008). A superativação dessa via é uma das alterações que auxiliam a iniciação e a evolução do GB, além de contribuir para a aquisição de um fenótipo resistente a terapia padrão. A presente dissertação buscou melhor compreender os mecanismos de resistência à radiação ionizante, bem como o potencial da nova molécula, o LQB-223, em sobrepujar esses mecanismos e inibir o processo de crescimento tumoral.

Nossos dados iniciais da caracterização do perfil de radiorresistência demonstram que doses baixas de radiação ionizante (2Gy e 4Gy) não fragmentam o DNA das linhagens em nenhum tempo observado, e induzem uma parada na fase G2/M do ciclo celular somente no tempo de 6h, com posterior normalização do perfil do ciclo celular. Enquanto, doses altas (8, 16 e 24 Gy) fragmentam o DNA de duas linhagens das três analisadas a partir de 48h de exposição, além de induzir uma parada em G2/M mais prolongada, até 48h após a exposição. Tratamentos que induzem a quebra da dupla fita do DNA, como a radiação ionizante, ativam mecanismos complexos de reparo ao dano. Em síntese, ocorre inicialmente uma parada na fase do ciclo celular e ativação de mecanismos de reparo ao dano, como a Recombinação Homóloga (HR) e a Recombinação *não-Homóloga* (NHEJ), caso o dano não seja reparado, a morte celular por apoptose é induzida (ROOS e KAINA, 2006). A fragmentação do DNA é um dos eventos que podem ocorrer durante a morte celular por apoptose, entretanto somente a sua avaliação não é suficiente para confirmar esse tipo de morte celular. Diante de tais informações, é possível inferir que as linhagens de GB apresentaram resistência às baixas doses de radiação ionizante, induzindo uma parada no ciclo celular rápida e transiente, com provável reparo do dano. Entretanto, com o aumento das doses e conseqüentemente do dano ao DNA, a parada no ciclo celular é mais prolongada na tentativa de reparar esse dano. A indução de fragmentação do DNA, nas linhagens

U251 e T98G, em tempos e doses superiores, pode ser explicada por um reparo de dano ineficiente, enquanto a não indução na linhagem A172 por um reparo eficiente.

A avaliação de sensibilidade à radiação ionizante proposta no estudo, demonstrou que a linhagem A172 apresenta um perfil radorresistente. Levando-se em consideração algumas características moleculares diferenciais entre as linhagens de GB e a sua relação com a resistência a radiação ionizante, sabemos que a presença de EGFR mutado somente é encontrado na linhagem U251. E que sua expressão nos tumores causa resistência à radiação ionizante (MUKHERJEE, et al., 2009); enquanto que a presença de mutação no gene TP53, é encontrado tanto na linhagem U251 quanto na T98G, e tal mutação na presença de outras, da via ATM/Chk2/p53 contribuem para a resistência a radiação (SQUATRITO, et al., 2010). Além disso, a maioria dos grupos que estuda a resistência à radiação ionizante, utiliza a linhagem A172 como um modelo de TP53 selvagem, e sensível à radiação ionizante, inclusive quando comparada a linhagem U251 (SHEN, Y. et al., 2011), Somente um trabalho publicado mostrou que a linhagem A172 demonstra um perfil radorresistente. No estudo, foi mostrado que a linhagem possui TP53 mutado, e não houve fragmentação do DNA até a dose de 20Gy. Também foi demonstrado sensibilidade a radiação quando o gene de TP53 foi re-expresso por terapia gênica (BADIE, et al., 1999). A parada na fase G1 do ciclo celular costuma ser preferencial em tumores com TP53 selvagem, enquanto nos tumores com o gene mutante a parada costuma ocorrer em G2/M (KASTAN e BARTEK, 2004), o que reproduz o que foi observado na linhagem T98G. É possível inferir que na linhagem A172, com o tempo prolongado de cultura tenha ocorrido mutações em outros genes da via de reparo ao dano, como em Chk2, ATM ou até mesmo no gene de TP53, o que poderia explicar o seu perfil radorresistente (SQUATRITO et al., 2010). A análise de diferentes mutações, em 34 linhagens de glioblastoma, revelou uma taxa de mutação em TP53 de 76,5% (ISHII, et al., 1999), valor este superior a taxa de 31% encontrada em pacientes (ONGAKI et al., 2004). Tal diferença demonstra que as linhagens acumulam mutações ao longo de suas passagens. Para confirmar o perfil de radorresistência em nossas linhagens (A172>T98G>U251) é fundamental a sua melhor caracterização, através de outros ensaios, como por exemplo, a análise de p-H2AX, além da avaliação de possíveis moléculas envolvidas no perfil da linhagem irradiada. Uma dessas moléculas são os microRNAs, que regulam a expressão gênica de forma pós transcricional de diversos processos de uma célula tumoral, inclusive os relacionados com resistência a terapia (GOMES, et al., 2016). Após

exposição à radiação ionizante foram observadas alterações em inúmeros microRNAs das linhagens de GB, indicando o envolvimento dessas moléculas na resposta diferencial ao tratamento (CHAUDHRY, et al., 2010 ; NIEMOELLER, et al., 2011). Além disso, evidências sugerem que a modulação de p53 e seus alvos, por microRNAs oncogênicos contribuem para a resistência à terapia (BESSE, et al., 2013 ; HERMEKING, 2012), sendo o microRNA-125b um dos principais reguladores dessa via (LE, et al., 2011). Portanto, prosseguimos com a caracterização do perfil de radiorresistência da linhagem U251, investigando os níveis do microRNA-125b após a exposição à radiação ionizante, na tentativa de correlacionar a modulação de sua expressão com o perfil analisado. A linhagem U251 foi exposta as doses de 8 e 16Gy, e após 24 e 48h a expressão relativa do microRNA-125b foi verificada. Houve um aumento nos níveis de expressão do microRNA-125b, embora não significativo, após o tratamento, em ambas as doses de 8 e 16Gy, após 24h. Porém, em 48h os níveis de expressão deste microRNA foi diminuído na dose de radiação de 16Gy, de forma não significativa.

O aumento dos níveis do microRNA-125b em 24h pode ter contribuído para a resistência observada no ensaio de fragmentação de DNA, nas mesmas condições. Por outro lado, a diminuição de sua expressão em 48h após a exposição de 16Gy, sugere a perda de uma molécula oncogênica, que pode contribuir para a via de supressão tumoral e indução de aumento na fragmentação do DNA no tempo de 48h. Não existem relatos na literatura, no entanto, sobre o mecanismo pela qual a radiação ionizante é capaz de alterar os níveis dos microRNAs. TAN e colaboradores (2012) publicaram que o estresse induzido por radiação ultravioleta é capaz de aumentar os níveis de microRNA-125b. Esse aumento foi mediado pela ativação de NF- κ B (*Nuclear Factor* κ B), induzido pela radiação ultravioleta. NF- κ B ativo se liga ao promotor do gene do microRNA-125b, aumentando a sua transcrição. Também, foi descrito que a radiação ionizante aumenta a expressão de NF- κ B, induzindo à radiorresistência (MAGNÉ, et al., 2006). Diante dessas informações, torna-se relevante avaliar a contribuição do NF- κ B na regulação da expressão do microRNA-125b. Com as técnicas utilizadas, em nosso modelo experimental, não podemos afirmar que a modulação do microRNA-125b contribuiu na alteração do perfil de radiorresistência. Portanto, iremos prosseguir com o estudo avaliando a expressão do microRNA-125b após a radiação ionizante em um maior número de linhagens de GB. E se os resultados forem promissores, reduziremos a

sua expressão utilizando antagomiRs e verificaremos se ocorre sensibilização ao tratamento.

O tratamento de pacientes com GB teve pouco avanço nos últimas décadas, sendo a última alteração realizada há 11 anos com a inserção do quimioterápico TMZ, o qual proporcionou um ganho de sobrevida de 2,5 meses (STUPP, et al., 2005). Pela falta de opções terapêuticas, muitas moléculas recém-desenhadas ou utilizadas no tratamento de outras neoplasias, estão sendo testadas em pacientes com GB (ALIFIERIS e TRAFALIS, 2015).

O presente estudo investigou o papel do composto LQB-223, quanto ao seu potencial efeito antitumoral em linhagens de GB. Observamos que o LQB-223 modula características essenciais de uma célula tumoral induzindo perda de adesão, redução na viabilidade e proliferação celular, parada na fase G2/M do ciclo celular e morte celular por apoptose (Figura 6.1).

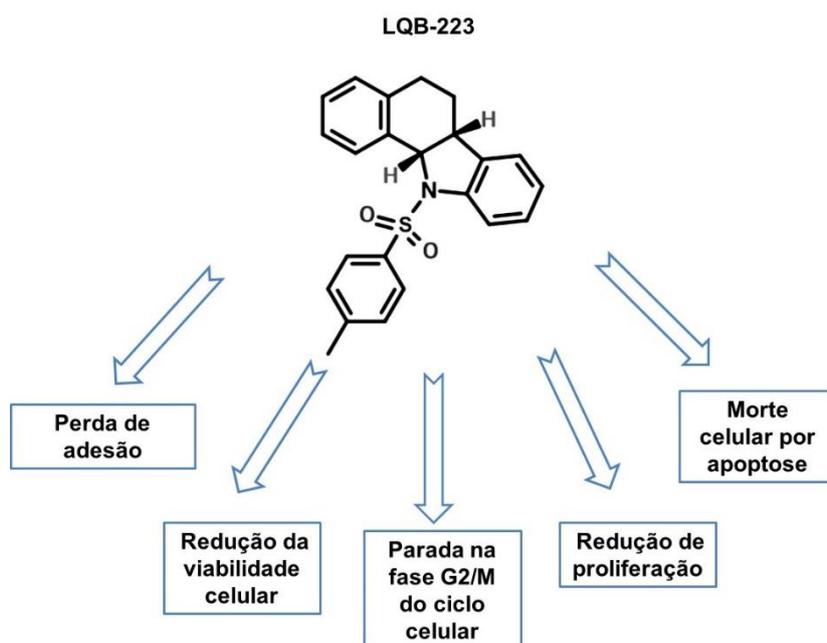


Figura 6.1 Resumo das alterações induzidas pelo composto LQB-223 nas linhagens de glioblastoma (GB). Figura expando as diferentes respostas das linhagens de GB mediante ao tratamento com o LQB-223.

Iniciamos a investigação do potencial antitumoral do LQB-223 através de um ensaio de viabilidade celular por MTT, no qual demonstra que as concentrações de 10 e 20 μ M reduzem a porcentagem de células viáveis, em aproximadamente 50%

no tempo de 72h nas três linhagens analisadas, sendo a redução na linhagem A172 em menores níveis. Somente dois trabalhos foram publicados avaliando o LQB-223 como uma molécula promissora para tratamento do câncer. Em ambos, a viabilidade celular, após a incubação com o composto, foi verificada em um total de sete linhagens de diferentes tipos tumorais (leucemias, carcinoma de cólon, melanoma e GB), e o IC50 foi calculado (concentração máxima de um fármaco que é necessária para inibir 50% da viabilidade celular) (BUARQUE, et al., 2011 ; BUARQUE, et al., 2014). Nesses trabalhos, o IC50 das linhagens analisadas não ultrapassou a faixa de 3 μ M de LQB-223, o que indica que em nossas linhagens há a necessidade de maiores concentrações do composto de forma a verificarmos reduções de viabilidade celular significativas. No entanto, a redução na viabilidade celular observada nas linhagens de GB com o composto LQB-223 se torna relevante quando comparamos tal achado com um trabalho do nosso grupo que analisa a redução da viabilidade celular com a TMZ. Esse experimento demonstrou que não houve redução da viabilidade celular das linhagens de GB ao tratamento com a TMZ, até a concentração de 1000 μ M (BERNARDO, P.S., dados não publicados). Algumas características são necessárias para que um novo composto seja promissor, dentre elas a seletividade, ou seja, que a molécula possua alta toxicidade para as células tumorais, e baixa para as células normais. Para responder essa questão, BUARQUE, C.D. e colaboradores (2014) coletaram linfócitos do baço de camundongos *Swiss* saudáveis, cultivaram em cultura, e trataram com 10 μ M de LQB-223. Não foi observado redução da viabilidade celular, após o tratamento o que pode indicar uma baixa toxicidade do composto LQB-223 para o sistema imune. Em estudos *in vivo*, o composto foi bem tolerado quando administrado por gavagem em camundongos *Swiss* na concentração de 50 e 100 mg/Kg, uma vez ao dia durante três dias (CORTOPASSI, et al., 2014). Além disso, dados não publicados do nosso grupo demonstraram que o composto LQB-223 não reduz a viabilidade celular em PBMC de indivíduos saudáveis, até a concentração de 20 μ M. Portanto, sendo o LQB-223 seletivo para as células tumorais, aprofundamos o estudo de forma a verificar o seu efeito na proliferação celular e na indução de morte por apoptose. Ocorreu uma redução na formação do número de colônias em nossas linhagens a partir de 2,5 μ M de LQB-223, indicando que o composto inibe a proliferação celular. Em seguida, ao avaliar o perfil do ciclo celular observamos uma parada na fase G2/M, após a incubação com as concentrações de 10 e 20 μ M de LQB-223, reforçando o achado de que houve redução na proliferação celular. A parada em

qualquer fase do ciclo celular costuma indicar algum dano ao DNA, com possível indução de morte. Assim sendo, confirmamos a morte celular por apoptose ao tratamento com o composto pelo aumento da exposição de fosfatidilserina, da fragmentação do DNA e da expressão de capase-3 clivada. Além dos resultados citados, foi observada perda de adesão celular ao fundo da garrafa, provavelmente como consequência do processo de morte celular. Todas as alterações observadas no GB estão de acordo com os resultados da literatura e também em estudos do nosso grupo. Um estudo utilizando as linhagens K562, Lucena e FEPS de leucemia mielóide crônica tratadas com o composto LQB-223, observou redução na proliferação celular pela incorporação de [³H]-Timidina, parada na fase G2/M do ciclo celular, além de uma alta taxa de fragmentação do DNA (BUARQUE, et al., 2014). Dados do nosso grupo em linhagens de câncer de mama, mostram uma redução na proliferação celular pelo ensaio clonogênico e um aumento na indução de morte por apoptose demonstrado pela marcação de anexinaV e redução de pro-caspase-7, -9 e -3 (LEMOS, L.G.T., dados não publicados).

Quando avaliamos a resposta das linhagens à radiação ionizante, foi verificado que ocorreu parada na fase G2/M do ciclo celular, independente do *status* do gene de TP53. De forma semelhante, o efeito antitumoral ocorreu tanto nas linhagens com o gene da TP53 mutado (U251 e T98G) quanto na linhagem com o gene selvagem (A172). Reforçando tal observação, os dados no modelo de câncer de mama mostram que o composto foi citotóxico nas linhagens MCF-7 (P53 selvagem) e MDA-MB-231 (P53 mutado), e que o efeito na MCF-7 pode estar relacionado ao aumento dos níveis das proteínas p53 e p21 (LEMOS, L.G.T., dados não publicados). A indução de morte celular, de forma independente de p53, induzida pelo LQB-223, tem potencial relevância para os tumores com altas taxas de mutação em seu gene, como no GB no qual a mutação ocorre em 31% dos pacientes (OHGAKI, et al., 2004).

A análise dos trabalhos publicados, e em andamento com o LQB-223, nos revela mais uma informação. Dentre as linhagens testadas em células da leucemia mielóide crônica, temos a K562 como a parental, e a Lucena e a FEPS, ambas exibindo fenótipo MDR e derivadas da K562. Apesar do fenótipo de resistência, a atividade citotóxica do LQB-223 foi demonstrada nas três linhagens de LMC (BUARQUE, et al., 2014). Dessa forma, ressaltamos a seletividade do composto para linhagens com perfil MDR. Resultados não publicados do nosso grupo demonstram que o LQB-223 apresenta efeito citotóxico em uma linhagem resistente

ao quimioterápico citarabina em células da leucemia mielóide aguda e também em linhagem de câncer de mama resistente ao quimioterápico doxorrubicina.

Diferenças quanto às alterações induzidas pelo novo composto LQB-223, nas linhagens de GB, tornam-se evidentes quando comparamos o tratamento de 5 μ M com o de 10 e 20 μ M. As mais altas taxas de fragmentação do DNA são induzidas após a incubação com 5,0 μ M de LQB-223, em todos os tempos analisados, enquanto as concentrações de 10 e 20 μ M induzem aumento na fragmentação do DNA de forma tempo dependente, atingindo os maiores níveis em 72h. Tais observações ocorrem de forma mais pronunciada nas linhagens U251 e T98G. Além disso, a concentração de 5 μ M do composto não induziu parada na fase G2/M do ciclo celular, sendo esse fenômeno somente observado após a incubação com 10 e 20 μ M de LQB-223. A indução de fenótipo diferencial pode ocorrer na dependência da concentração de um composto, como ocorre com o docetaxel, um quimioterápico utilizado principalmente para o tratamento de câncer de mama (HERNÁNDEZ-VARGAS, et al., 2007). Em células de câncer de mama *in vitro*, baixas concentrações de docetaxel são capazes de induzir mitose aberrante seguido por necrose tardia, enquanto altas concentrações induzem parada no ciclo celular e apoptose. Além disso, baixas concentrações induziram uma alta taxa de fragmentação de DNA que não se repetiu em concentrações mais elevadas (HERNÁNDEZ-VARGAS, et al., 2007). Esse fato demonstra que o LQB-223 pode atuar de formas diferentes de acordo com a concentração utilizada, sendo necessária a continuidade da avaliação de seu efeito antitumoral, bem como a melhor compreensão do seu mecanismo de ação.

A partir dos resultados observados, onde o composto LQB-223 demonstrou potencial atividade antitumoral em células de GB, o estudo prosseguiu na investigação do mecanismo de ação. Pelo fato do composto induzir diminuição na viabilidade e proliferação celular iniciamos a investigação do mecanismo de ação verificando algumas proteínas integrantes do eixo EGFR/Raf/MEK/ERK. Este apresenta grande importância na carcinogênese do GB e na resistência ao tratamento padrão (HATANPAA, et al., 2010). Houve redução da expressão da forma total da proteína Ras, assim como da fosforilação de ERK (Figura 6.2). Com o propósito de investigar a modulação de algumas proteínas dessa via e a morte celular observada, os níveis de expressão do miR-7 e do miR-125b foram verificados. O LQB-223 aumentou os níveis de expressão do miR-7 em duas das três linhagens de GB analisadas (Figura 6.2), e da expressão do miR-125b, embora

de forma não significativa, na linhagem U251. Baseado no fato de que a principal via oncogênica suprimida pelo miR-7, é a via dos RTKs, além de ter sido descrito regulando duas proteínas inibidoras da apoptose (ZHAO, et al., 2015), sugerimos que o aumento do miR-7 seja um dos fatores responsáveis pela redução dessa via e a indução das alterações observadas. Além disso, uma maior fosforilação da proteína H2AX foi observada, o que levanta questionamentos de como o composto LQB-223 estaria induzindo a quebra na dupla fita do DNA (Figura 6.2).

Em relação ao aumento, não significativo, dos níveis de miR-125b, algumas hipóteses são levantadas. Caso a expressão deste microRNA diminuísse poderíamos relacionar tal fato com o mecanismo de ação do LQB-223, visto que no nosso modelo de estudo sua expressão aumentada, conforme já descrito (WU, et al., 2013) favorece a oncogênese e inibe a apoptose induzida pelo agente citotóxico, o ácido trans-retinóico (XIA, et al., 2009). Uma possibilidade plausível seria a de que este leve aumento nos níveis do microRNA-125b fosse um mecanismo inicial, utilizado pela linhagem do nosso estudo, a fim de tentar reverter a morte celular induzida pelo composto LQB-223. Entretanto, esse mecanismo é pouco provável uma vez que o composto induziu morte celular na linhagem U251, possivelmente pela maior indução de vias de supressão tumoral.

Com base em todas as alterações induzidas nas linhagens de GB pelo composto LQB-223 e os trabalhos publicados, ou em andamento, sobre esse composto, possíveis mecanismos de ação foram propostos. O primeiro eixo de regulação foi o aumento do miR-7 induzido pelo LQB-223, colaborando na redução da via oncogênica EGFR/Ras/Raf/MEK/ERK1-2. Outra hipótese sobre a regulação dessa via seria pela ação do LQB-223 como um inibidor da atividade tirosina quinase desse receptor. Por último, e explicando a quebra da dupla fita do DNA e outros fenômenos, o composto LQB-223 pode estar atuando como um inibidor de topoisomerase I e II α . (Figura 6.2).

Um dos mecanismos de ação propostos para as alterações observadas nas linhagens de GB induzidas pelo LQB-223, foi através do aumento do microRNA-7 e sua repressão da via oncogênica EGFR/Ras/Raf/MEK/ERK1-2. De acordo com a literatura, o miR-7 atua em GB como um supressor tumoral, reduzindo a viabilidade, a proliferação celular, a metástase e a invasão tumoral, bem como o aumento de morte celular por apoptose (KEFAS, et al., 2008 ; WU, et al., 2011 ; WANG, et al., 2013 ; LIU, et al., 2014a ; BABAE, et al., 2014). A indução dos diversos fenótipos de supressão tumoral são explicados principalmente pela capacidade dessa molécula

de regular a sinalização ativada pelo EGFR por múltiplos alvos. Isto pode ocorrer de forma direta através da regulação negativa da expressão gênica de EGFR e Raf1 (WEBSTER, et al., 2009), ou pela redução de forma indireta da fosforilação de AKT e ERK (KEFAS, et al., 2008 ; WANG, et al., 2013). O efeito antitumoral do quimioterápico docetaxel (HE, et al., 2015) e de um composto natural denominado curcumina (MA, et al., 2014), têm sido justificado pelo aumento dos níveis de expressão do microRNA-7. Dessa forma, podemos explicar o aumento do microRNA-7 ou até mesmo a inibição da expressão da proteína Ras induzido pelo LQB-223 nas linhagens de GB, por meio de uma regulação no nível transcricional. Até o momento dois fatores de transcrição foram descritos aumentando a expressão do micro-RNA-7: o c-Myc pela ligação em sua região promotora em linhagem de câncer de pulmão (CHOU, et al., 2010) e o FOXP3 pela ligação em regiões próximas do seu gene, em câncer de mama (MCINNES, et al., 2012). Nosso grupo demonstrou que a atividade antitumoral de outro composto, denominado LQB-118, em linhagens de leucemia mielóide aguda (LMA) foi associada à modulação dos fatores de transcrição FoxO3a and FoxM1 (NESTAL DE MORAES, et al., 2014). Porém, em células de leucemia mielóide crônica, a modulação da localização subcelular de NFκB (Fator nuclear potencializador do gene polipeptídeo kappa leve em células B) parece estar relacionada a alteração dos níveis de expressão de microRNA-9 e - 21 (DE FARIA, et al., 2015). A regulação dos microRNAs induzidas pelo tratamento com compostos naturais tem surgido como uma nova estratégia para o tratamento do câncer, especialmente quando combinado com terapias convencionais (SETHI, et al., 2013). Em conformidade, a indução de sensibilidade à terapia com radiação ionizante é descrita após o aumento de expressão de miR-7 (LEE, et al., 2011).

Outra hipótese levantada em nosso estudo, e que poderia explicar a modulação da via ativada pelo EGFR pelo novo composto, seria a sua atuação como um inibidor da atividade tirosina quinase. Em relação à estrutura química da LQB-223 (fusão do grupamento benzocarbazol com a sulfonamida), observou-se que quando a estrutura do benzocarbazol foi preservada, pela retirada do grupamento sulfonamida ou pela troca por outro grupamento, altas concentrações de LQB-223 foram necessárias para induzir a IC50 nos testes de viabilidade celular. Isso demonstra que a presença da sulfonamida é essencial para a indução do mecanismo antitumoral (BUARQUE, et al., 2011 ; BUARQUE, et al., 2014). Ultimamente diversos compostos contendo a sulfonamida em sua estrutura, estão

sendo sintetizados e analisados, demonstrando significativa atividade antitumoral por uma variedade de mecanismos de ação (SCOZZAFAVA, et al., 2003), inclusive como potenciais inibidores da atividade tirosina quinase de EGFR (LUO, et al., 2011).

Outra hipótese sobre o mecanismo de ação do LQB-223 é a de que este composto induz o aumento da fosforilação da histona H2AX, um marcador de quebra de dupla fita de DNA, bem como as outras alterações observadas pela inibição de topoisomerase. Trabalhos publicados e em andamento, do nosso grupo, utilizando abordagens de modelagem molecular e ensaios de atividade enzimática, demonstram que o LQB-223 é um inibidor das topoisomerasas. A observação de que o LQB-223 se intercala no sítio da topoisomerase I, responsável pela clivagem do DNA, sugere a sua atuação como um inibidor não competitivo, tal como o inibidor topotecano (CORTOPASSI, et al., 2014). Além disso, dados não publicados do nosso grupo, demonstram que o LQB-223 é um inibidor catalítico da topoisomerase IIa, e sugere se ligar ao sítio ATPase dessa enzima. Huang e colaboradores (2003), mostraram que a fosforilação de H2AX em resposta ao dano ao DNA foi induzida pela inibição de topoisomerase I e topoisomerase II, e que tal evento se correlaciona com a fase do ciclo celular em que a célula se encontra. Além disso, o estudo foi realizado em linhagens leucêmicas, no qual a inibição das topoisomerasas levam a quebra de dupla fita do DNA, constatado pelo aumento da fosforilação de H2AX, estimulando a célula à morte celular por apoptose associada à quebra de dupla fita (HUANG, et al., 2003). Estudos iniciais com inibidores de topoisomerase I, a camptotecina, irinotecano e o NKTR-102, e os inibidores de topoisomerase II, o etoposídeo e o teniposídeo, vêm demonstrando eficácia contra linhagens de GB *in vitro* (TAMURA, et al., 2012). Além disso, o estudo com o NKTR-102 se encontra em fase II, para o tratamento de GB resistentes ao bevacizumab (NCT01663012).

O acúmulo de conhecimento a respeito do novo composto, adquirido pelo nosso grupo, e pelos grupos de pesquisadores colaboradores, nos permite propor possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antitumoral do composto LQB-223 nas linhagens de GB. Pretende-se analisar as hipóteses levantadas em nosso estudo no projeto de doutorado do autor da presente dissertação. Temos como objetivos expandir as análises do efeito antitumoral do composto LQB-223 para modelos de xenotransplante de GB em camundongos imunodeficientes, bem como melhor caracterizar o mecanismo pelo qual o LQB-223 induz a quebra da dupla fita do DNA.

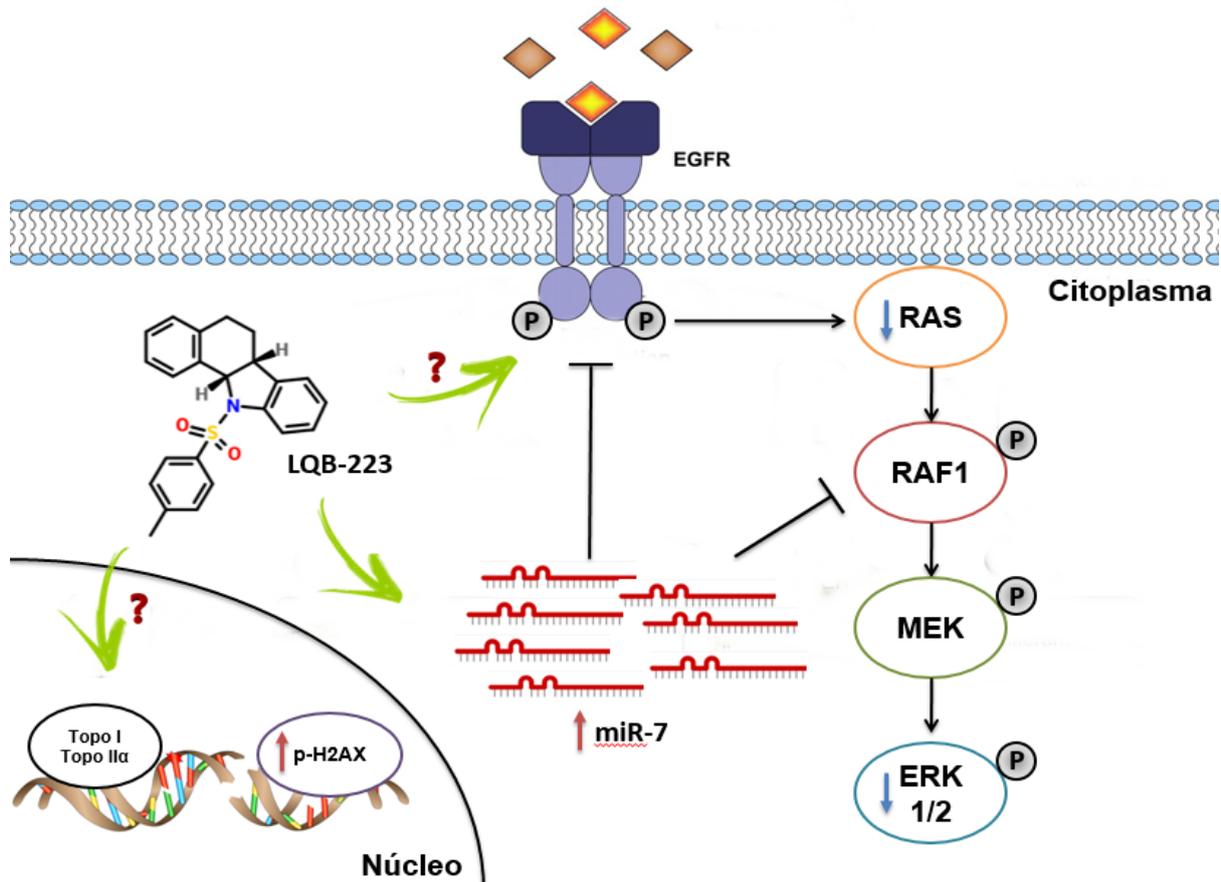


Figura 6.2 Mecanismo de ação proposto sobre o modo de atuação do composto LQB-223 nas linhagens de glioblastoma (GB). Resumo das alterações no nível proteico e de microRNAs induzidas pelo LQB-223, bem como propostas de eixos de regulação. A via é representada na sua forma ativa e na presença do composto. As setas vermelhas indicam um aumento dos níveis de fosforilação da proteína H2AX e da expressão de miR-7, enquanto as setas azuis indicam uma redução da expressão de Ras e da fosforilação de ERK1/2. Os eixos de regulação hipotetizados são representados pelas setas verdes. A redução da ativação da via de EGFR/Ras/Raf/MEK/ERK1/2 induzida pelo LQB-223, pode ser explicada através do aumento da expressão do miR-7, e/ou pela ação do composto como um possível inibidor da atividade tirosina quinase do EGFR. A indução de quebra de dupla fita do DNA pelo LQB-223 pode ser explicada pelo aumento de p-H2AX, esclarecida pela atuação da molécula como um inibidor de topoisomerase I e II α .

7) CONCLUSÕES

Em relação à caracterização do perfil de radiorresistência, nossos dados apontam para uma maior resistência das linhagens estudadas às baixas doses de radiação ionizante, enquanto a linhagem A172 mostrou-se mais resistente a todas as doses utilizadas. O aumento do microRNA-125b na linhagem U251, induzido pela radiação ionizante, sugere o seu papel na aquisição de um perfil resistente.

O novo composto LQB-223 possui um grande potencial antitumoral tanto nas linhagens de GB sensíveis quanto nas resistentes à radiação ionizante. O seu efeito antitumoral engloba a redução na viabilidade e na proliferação celular, um acúmulo na fase G2/M do ciclo celular, aumento da fragmentação do DNA e da morte celular por apoptose. Os nossos dados também sugerem que o composto LQB-223 é possivelmente um indutor de quebra de dupla fita do DNA. Os efeitos observados podem ser parcialmente explicados pelo aumento na expressão do miR-7, e inibição da via das MAPK ERK1/2 em diferentes níveis.

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alifieris, C. and D.T. Trafalis, *Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment*. Pharmacol Ther, 2015. **152**: p. 63-82.

Babae, N., et al., *Systemic miRNA-7 delivery inhibits tumor angiogenesis and growth in murine xenograft glioblastoma*. Oncotarget, 2014. **5**(16): p. 6687-700.

Badie, B., et al., *Combined radiation and p53 gene therapy of malignant glioma cells*. Cancer Gene Ther, 1999. **6**(2): p. 155-62.

Balss, J., et al., *Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors*. Acta Neuropathol, 2008. **116**(6): p. 597-602.

Barallon, R., et al., *Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010. **46**(9): p. 727-32.

Besse, A., et al., *MicroRNAs involved in chemo- and radioresistance of high-grade gliomas*. Tumour Biol, 2013. **34**(4): p. 1969-78.

Bocangel, D.B., et al., *Multifaceted resistance of gliomas to temozolomide*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(8): p. 2725-34.

Brennan, C.W., et al., *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. Cell, 2013. **155**(2): p. 462-77.

Buarque, C.D., et al., *Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on Leishmania amazonensis*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(22): p. 6885-91.

Buarque, C.D., et al., *11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines*. Eur J Med Chem, 2014. **78**: p. 190-7.

Bustin, S.A., *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.* J Mol Endocrinol, 2002. **29**(1): p. 23-39.

Cahoon, E.K., et al., *Immune-related conditions and subsequent risk of brain cancer in a cohort of 4.5 million male US veterans.* Br J Cancer, 2014. **110**(7): p. 1825-33.

Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.

Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.

Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways.* Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.

Cao, J.Q., et al., *Hypofractionated radiotherapy with or without concurrent temozolomide in elderly patients with glioblastoma multiforme: a review of ten-year single institutional experience.* J Neurooncol, 2012. **107**(2): p. 395-405.

Chaudhry, M.A., H. Sachdeva, and R.A. Omaruddin, *Radiation-induced micro-RNA modulation in glioblastoma cells differing in DNA-repair pathways.* DNA Cell Biol, 2010. **29**(9): p. 553-61.

Chou, Y.T., et al., *EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF.* Cancer Res, 2010. **70**(21): p. 8822-31.

Cortopassi, W.A., et al., *Theoretical and experimental studies of new modified isoflavonoids as potential inhibitors of topoisomerase I from Plasmodium falciparum.* PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91191.

Costa, L., et al., *Pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in Leishmania (Viannia) braziliensis and controls lesions in infected hamsters*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109672.

da Cunha-Junior, E.F., et al., *Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(7): p. 1555-9.

da Silva, A.J., et al., *Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new (+/-) 1,4-naphthoquinones structurally related to lapachol*. Bioorg Med Chem, 2002. **10**(8): p. 2731-8.

de Faria, F.C., et al., *NFkappaB pathway and microRNA-9 and -21 are involved in sensitivity to the pterocarpanquinone LQB-118 in different CML cell lines*. Anticancer Agents Med Chem, 2015. **15**(3): p. 345-52.

de Faria, G.P., et al., *Differences in the expression pattern of P-glycoprotein and MRP1 in low-grade and high-grade gliomas*. Cancer Invest, 2008. **26**(9): p. 883-9.

de Sa Bacelar, T., et al., *The pterocarpanquinone LQB 118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway*. Anticancer Drugs, 2013. **24**(1): p. 73-83.

de Souza Reis, F.R., et al., *The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells*. Anticancer Agents Med Chem, 2013. **13**(2): p. 341-51.

de Vries, N.A., et al., *Restricted brain penetration of the tyrosine kinase inhibitor erlotinib due to the drug transporters P-gp and BCRP*. Invest New Drugs, 2012. **30**(2): p. 443-9.

Di Leva, G., M. Garofalo, and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 287-314.

Dickey, J.S., et al., *The role of miRNA in the direct and indirect effects of ionizing radiation*. Radiat Environ Biophys, 2011. **50**(4): p. 491-9.

Dittmann, K., et al., *Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2005. **280**(35): p. 31182-9.

Djuranovic, S., A. Nahvi, and R. Green, *A parsimonious model for gene regulation by miRNAs*. Science, 2011. **331**(6017): p. 550-3.

Dong, L., et al., *miRNA microarray reveals specific expression in the peripheral blood of glioblastoma patients*. Int J Oncol, 2014. **45**(2): p. 746-56.

Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.

Geng, L., et al., *STI571 (Gleevec) improves tumor growth delay and survival in irradiated mouse models of glioblastoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **64**(1): p. 263-71.

Goldie, J.H., *Drug resistance in cancer: a perspective*. Cancer Metastasis Rev, 2001. **20**(1-2): p. 63-8.

Golding, S.E., et al., *Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(8): p. 730-8.

Gomes, B.C., J. Rueff, and A.S. Rodrigues, *MicroRNAs and Cancer Drug Resistance*. Methods Mol Biol, 2016. **1395**: p. 137-62.

Goodenberger, M.L. and R.B. Jenkins, *Genetics of adult glioma*. Cancer Genet, 2012. **205**(12): p. 613-21.

Gu, D.N., Q. Huang, and L. Tian, *The molecular mechanisms and therapeutic potential of microRNA-7 in cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2015. **19**(3): p. 415-26.

Haar, C.P., et al., *Drug resistance in glioblastoma: a mini review*. Neurochem Res, 2012. **37**(6): p. 1192-200.

Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.

Happold, C., et al., *ACNU-based chemotherapy for recurrent glioma in the temozolomide era*. J Neurooncol, 2009. **92**(1): p. 45-8.

Hatanpaa, K.J., et al., *Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance*. Neoplasia, 2010. **12**(9): p. 675-84.

Hayes, J., P.P. Peruzzi, and S. Lawler, *MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy*. Trends Mol Med, 2014. **20**(8): p. 460-9.

He, X., et al., *Docetaxel inhibits the proliferation of non-small-cell lung cancer cells via upregulation of microRNA-7 expression*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(8): p. 9072-80.

Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.

Hermeking, H., *MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(9): p. 613-26.

Hernandez-Vargas, H., J. Palacios, and G. Moreno-Bueno, *Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis*. Oncogene, 2007. **26**(20): p. 2902-13.

Holdhoff, M. and S.A. Grossman, *Controversies in the adjuvant therapy of high-grade gliomas*. Oncologist, 2011. **16**(3): p. 351-8.

Holmen, S.L. and B.O. Williams, *Essential role for Ras signaling in glioblastoma maintenance*. Cancer Res, 2005. **65**(18): p. 8250-5.

Horsham, J.L., et al., *MicroRNA-7: A miRNA with expanding roles in development and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2015. **69**: p. 215-24.

Horsham, J.L., et al., *Clinical Potential of microRNA-7 in Cancer*. J Clin Med, 2015. **4**(9): p. 1668-87.

Huang, X., F. Traganos, and Z. Darzynkiewicz, *DNA damage induced by DNA topoisomerase I- and topoisomerase II-inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis*. Cell Cycle, 2003. **2**(6): p. 614-9.

Johns, T.G., et al., *MAB 806 enhances the efficacy of ionizing radiation in glioma xenografts expressing the de2-7 epidermal growth factor receptor*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010. **78**(2): p. 572-8.

Johnson, D.R. and B.P. O'Neill, *Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era*. J Neurooncol, 2012. **107**(2): p. 359-64.

Kalinowski, F.C., et al., *Regulation of epidermal growth factor receptor signaling and erlotinib sensitivity in head and neck cancer cells by miR-7*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47067.

Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 316-23.

Kefas, B., et al., *microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3566-72.

Keles, G.E., et al., *Volume of residual disease as a predictor of outcome in adult patients with recurrent supratentorial glioblastomas multiforme who are undergoing chemotherapy*. J Neurosurg, 2004. **100**(1): p. 41-6.

Kong, F., et al., *miR-125b confers resistance of ovarian cancer cells to cisplatin by targeting pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011. **31**(4): p. 543-9.

Koshkin, P.A., D.A. Chistiakov, and V.P. Chekhonin, *Role of microRNAs in mechanisms of glioblastoma resistance to radio- and chemotherapy*. *Biochemistry (Mosc)*, 2013. **78**(4): p. 325-34.

Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(Database issue): p. D68-73.

Kreisl, T.N., et al., *Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(5): p. 740-5.

Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. *Science*, 2001. **294**(5543): p. 853-8.

Lambertz, I., et al., *Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo*. *Cell Death Differ*, 2010. **17**(4): p. 633-41.

Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans**. *Science*, 2001. **294**(5543): p. 858-62.

Le, M.T., et al., *Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-125b occurs through evolving miRNA-target gene pairs*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(9): p. e1002242.

Le, M.T., et al., *MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53*. *Genes Dev*, 2009. **23**(7): p. 862-76.

Lee, K.M., E.J. Choi, and I.A. Kim, *microRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR-associated signaling*. *Radiother Oncol*, 2011. **101**(1): p. 171-6.

Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans**. *Science*, 2001. **294**(5543): p. 862-4.

Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.

Lee, Y.S. and A. Dutta, *MicroRNAs in cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 199-227.

Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.

Linz, U., *Chemotherapy for glioblastoma: is costly better?* Cancer, 2008. **113**(10): p. 2617-22.

Liu, H., et al., *miR-7 modulates chemoresistance of small cell lung cancer by repressing MRP1/ABCC1*. Int J Exp Pathol, 2015. **96**(4): p. 240-7.

Liu, R., et al., *MicroRNA-7 sensitizes non-small cell lung cancer cells to paclitaxel*. Oncol Lett, 2014. **8**(5): p. 2193-2200.

Liu, S., et al., *MicroRNA-7 downregulates XIAP expression to suppress cell growth and promote apoptosis in cervical cancer cells*. FEBS Lett, 2013. **587**(14): p. 2247-53.

Liu, Z., et al., *miR-7 inhibits glioblastoma growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways*. Int J Oncol, 2014. **44**(5): p. 1571-80.

Liu, Z., et al., *MiR-7-5p is frequently downregulated in glioblastoma microvasculature and inhibits vascular endothelial cell proliferation by targeting RAF1*. Tumour Biol, 2014. **35**(10): p. 10177-84.

Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

Lo, H.W., *Targeting Ras-RAF-ERK and its interactive pathways as a novel therapy for malignant gliomas*. Curr Cancer Drug Targets, 2010. **10**(8): p. 840-8.

Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.

Louis, D.N., et al., *International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading*. Brain Pathol, 2014. **24**(5): p. 429-35.

Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.

Luo, Y., et al., *Metronidazole acid acyl sulfonamide: a novel class of anticancer agents and potential EGFR tyrosine kinase inhibitors*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(20): p. 6069-76.

Luwor, R.B., et al., *The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR*. Oncogene, 2004. **23**(36): p. 6095-104.

Lyustikman, Y., et al., *Constitutive activation of Raf-1 induces glioma formation in mice*. Neoplasia, 2008. **10**(5): p. 501-10.

Ma, J., et al., *Curcumin inhibits cell growth and invasion through up-regulation of miR-7 in pancreatic cancer cells*. Toxicol Lett, 2014. **231**(1): p. 82-91.

Magne, N., et al., *NF-kappaB modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment*. Cancer Lett, 2006. **231**(2): p. 158-68.

Maia, R.C., et al., *LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells*. Invest New Drugs, 2011. **29**(6): p. 1143-55.

Malmer, B., et al., *GLIOGENE an International Consortium to Understand Familial Glioma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(9): p. 1730-4.

Malmer, B., et al., *Familial aggregation of astrocytoma in northern Sweden: an epidemiological cohort study*. Int J Cancer, 1999. **81**(3): p. 366-70.

Martino, T., et al., *The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits tumor cell proliferation by downregulation of c-Myc and cyclins D1 and B1 mRNA and upregulation of p21 cell cycle inhibitor expression*. Bioorg Med Chem, 2014. **22**(12): p. 3115-22.

McGirt, M.J., et al., *Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma*. J Neurosurg, 2009. **110**(1): p. 156-62.

McInnes, N., et al., *FOXP3 and FOXP3-regulated microRNAs suppress SATB1 in breast cancer cells*. Oncogene, 2012. **31**(8): p. 1045-54.

Mohri, M., H. Nitta, and J. Yamashita, *Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in human gliomas*. J Neurooncol, 2000. **49**(2): p. 105-15.

Mukherjee, B., et al., *EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4252-9.

Najman, H. e Gadelha, M.I.P. *Temozolamida*. Revista Brasileira de Cancerologia, 48(3): 439-45, 2002.

Naqvi, A.R., et al., *The fascinating world of RNA interference*. Int J Biol Sci, 2009. **5**(2): p. 97-117.

Nestal de Moraes, G., et al., *The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors*. Int J Oncol, 2014. **45**(5): p. 1949-58.

Netto, C.D., et al., *New pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF-alpha modulation in human PBMC cells*. Bioorg Med Chem, 2010. **18**(4): p. 1610-6.

Netto, C.D., et al., *(+/-)-3,4-Dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: cytotoxic effect on human leukemia cell lines*. Eur J Med Chem, 2009. **44**(2): p. 920-5.

Niemoeller, O.M., et al., *MicroRNA expression profiles in human cancer cells after ionizing radiation*. Radiat Oncol, 2011. **6**: p. 29.

Niyazi, M., et al., *Therapeutic options for recurrent malignant glioma*. Radiother Oncol, 2011. **98**(1): p. 1-14.

Nobusawa, S., et al., *IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(19): p. 6002-7.

Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-9.

Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(6): p. 479-89.

Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.

Ohgaki, H. and P. Kleihues, *The definition of primary and secondary glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(4): p. 764-72.

Omay, S.B. and M.A. Vogelbaum, *Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas*. Indian J Cancer, 2009. **46**(2): p. 88-95.

Ostrom, Q.T., et al., *The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review*. Neuro Oncol, 2014. **16**(7): p. 896-913.

Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012*. Neuro Oncol, 2015. **17 Suppl 4**: p. iv1-iv62.

Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.

Patel, M., et al., *Salvage reirradiation for recurrent glioblastoma with radiosurgery: radiographic response and improved survival*. J Neurooncol, 2009. **92**(2): p. 185-91.

Pelloski, C.E., et al., *Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(13): p. 3935-41.

Phillips, H.S., et al., *Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 157-73.

Portes Jde, A., et al., *A new type of pterocarpanquinone that affects Toxoplasma gondii tachyzoites in vitro*. Vet Parasitol, 2012. **186**(3-4): p. 261-9.

Ramnarain, D.B., et al., *Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 867-74.

Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.

Ribeiro, G.A., et al., *LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in Leishmania amazonensis*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(4): p. 789-99.

Rich, J.N., et al., *Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma*. J Clin Oncol, 2004. **22**(1): p. 133-42.

Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.

Rogakou, E.P., et al., *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. J Cell Biol, 1999. **146**(5): p. 905-16.

Ron, E., et al., *Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood*. N Engl J Med, 1988. **319**(16): p. 1033-9.

Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death by apoptosis*. Trends Mol Med, 2006. **12**(9): p. 440-50.

Ryan, M.B., et al., *Targeting -mutant cancers: is ERK the key?* Trends Cancer, 2015. **1**(3): p. 183-198.

Salustiano, E.J., et al., *Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alpha-lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells*. Invest New Drugs, 2010. **28**(2): p. 139-44.

Sanson, M., et al., *Chromosome 7p11.2 (EGFR) variation influences glioma risk*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(14): p. 2897-904.

Sathornsumetee, S., et al., *Molecularly targeted therapy for malignant glioma*. Cancer, 2007. **110**(1): p. 13-24.

Sato, A., et al., *MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis*. Stem Cells, 2011. **29**(12): p. 1942-51.

Schmidt, F., et al., *PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma*. Neurology, 2006. **66**(4): p. 587-9.

Schwartzbaum, J., et al., *Association between prediagnostic IgE levels and risk of glioma*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(16): p. 1251-9.

Scott, G.K., et al., *Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b*. J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 1479-86.

Scozzafava, A., et al., *Anticancer and antiviral sulfonamides*. *Curr Med Chem*, 2003. **10**(11): p. 925-53.

Sethi, S., Y. Li, and F.H. Sarkar, *Regulating miRNA by natural agents as a new strategy for cancer treatment*. *Curr Drug Targets*, 2013. **14**(10): p. 1167-74.

Shenouda, S.K. and S.K. Alahari, *MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?* *Cancer Metastasis Rev*, 2009. **28**(3-4): p. 369-78.

Shete, S., et al., *Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma*. *Nat Genet*, 2009. **41**(8): p. 899-904.

Shi, X.B., et al., *miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes*. *Prostate*, 2011. **71**(5): p. 538-49.

Shinojima, N., et al., *Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme*. *Cancer Res*, 2003. **63**(20): p. 6962-70.

Siegel, T., *Clinical Relevance of Prognostic and Predictive Molecular Markers in Gliomas*. *Adv Tech Stand Neurosurg*, 2016(43): p. 91-108.

Snuderl, M., et al., *Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(6): p. 810-7.

Squatrito, M., et al., *Loss of ATM/Chk2/p53 pathway components accelerates tumor development and contributes to radiation resistance in gliomas*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(6): p. 619-29.

Squatrito, M. and E.C. Holland, *DNA damage response and growth factor signaling pathways in gliomagenesis and therapeutic resistance*. *Cancer Res*, 2011. **71**(18): p. 5945-9.

Stacey, S.N., et al., *A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility*. *Nat Genet*, 2011. **43**(11): p. 1098-103.

Stewart, L.A., *Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials*. Lancet, 2002. **359**(9311): p. 1011-8.

Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.

Sun, Y.M., K.Y. Lin, and Y.Q. Chen, *Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts*. J Hematol Oncol, 2013. **6**: p. 6.

Tabatabai, G., et al., *Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(5): p. 585-92.

Tamura, N., et al., *Analysis of type of cell death induced by topoisomerase inhibitor SN-38 in human oral squamous cell carcinoma cell lines*. Anticancer Res, 2012. **32**(11): p. 4823-32.

Tan, G., et al., *NF-kappaB-dependent microRNA-125b up-regulation promotes cell survival by targeting p38alpha upon ultraviolet radiation*. J Biol Chem, 2012. **287**(39): p. 33036-47.

Turinetto, V. and C. Giachino, *Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(5): p. 2489-98.

Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.

Visani, M., et al., *Expression of 19 microRNAs in glioblastoma and comparison with other brain neoplasia of grades I-III*. Mol Oncol, 2014. **8**(2): p. 417-30.

Walsh, K.M., et al., *Variants near TERT and TERC influencing telomere length are associated with high-grade glioma risk*. Nat Genet, 2014. **46**(7): p. 731-5.

Walsh, K.M., H. Ohgaki, and M.R. Wrensch, *Epidemiology*. Handb Clin Neurol, 2016. **134**: p. 3-18.

Wang, H., et al., *Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34210.

Wang, W., et al., *Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by plasmid-based microRNA-7 inhibits human malignant gliomas growth and metastasis in vivo*. Neoplasma, 2013. **60**(3): p. 274-83.

Webster, R.J., et al., *Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7*. J Biol Chem, 2009. **284**(9): p. 5731-41.

Weller, M., *Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma*. Swiss Med Wkly, 2011. **141**: p. w13210.

Wen, P.Y., *New therapies for recurrent glioblastomas*. F1000 Med Rep, 2009. **1**.

Westholm, J.O. and E.C. Lai, *Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing*. Biochimie, 2011. **93**(11): p. 1897-904.

Whitfield, G.A., et al., *Imaging and target volume delineation in glioma*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2014. **26**(7): p. 364-76.

Winum, J.Y., et al., *Polypharmacology of sulfonamides: pazopanib, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in clinical use, potently inhibits several mammalian carbonic anhydrases*. Chem Commun (Camb), 2012. **48**(66): p. 8177-9.

Wrensch, M., et al., *Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility*. Nat Genet, 2009. **41**(8): p. 905-8.

Wrensch, M., et al., *History of chickenpox and shingles and prevalence of antibodies to varicella-zoster virus and three other herpesviruses among adults with glioma and controls*. Am J Epidemiol, 2005. **161**(10): p. 929-38.

Wu, D.G., et al., *MicroRNA-7 regulates glioblastoma cell invasion via targeting focal adhesion kinase expression*. Chin Med J (Engl), 2011. **124**(17): p. 2616-21.

Wu, N., et al., *MiR-125b acts as an oncogene in glioblastoma cells and inhibits cell apoptosis through p53 and p38MAPK-independent pathways*. Br J Cancer, 2013. **109**(11): p. 2853-63.

Xia, H.F., et al., *MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf*. Cell Physiol Biochem, 2009. **23**(4-6): p. 347-58.

Xiong, S., et al., *MicroRNA-7 inhibits the growth of human non-small cell lung cancer A549 cells through targeting BCL-2*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(6): p. 805-14.

Zacher, A., et al., *Molecular diagnostics of gliomas using next generation sequencing of a glioma-tailored gene panel*. Brain Pathol, 2016.

Zhao, J., et al., *MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy*. Cancer Cell Int, 2015. **15**: p. 103.

Zhou, M., et al., *MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21496-507.